

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Rastreo de fungos patogénicos e oportunistas em animais domésticos, selvagens e em humanos:  
Implicações na saúde pública**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Patrícia Daniela Matos Alves

**Orientadora**

Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho



Vila Real, 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Rastreo de fungos patogénicos e oportunistas em animais domésticos, selvagens e em humanos:  
Implicações na saúde pública**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Patrícia Daniela Matos Alves

**Orientadora**

Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho



Vila Real, 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Rastreio de fungos patogénicos e oportunistas em animais domésticos, selvagens e em humanos:  
Implicações na saúde pública**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Patrícia Daniela Matos Alves

**Orientadora**

Professora Doutora Ana Cláudia Correia Coelho

Composição do Júri:

---

---

---

Vila Real, 2017

**Este trabalho é uma obra original realizado para a obtenção do grau de Mestre em  
Biologia Clínica Laboratorial.**

## **Agradecimentos**

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), nomeadamente ao Magnífico Reitor, Professor Doutor António Fontainhas Fernandes, por todo o trabalho desenvolvido para o maior reconhecimento da instituição, possibilitando também aos alunos as condições necessárias para a realização de trabalhos de investigação.

Ao corpo docente e em especial à coordenação do Mestrado de Biologia Clínica Laboratorial, pelo profissionalismo, competência, amizade e apoio prestado.

À Professora Doutora Ana Cláudia Coelho, que me orientou ao longo deste trabalho, por todo o apoio, confiança, amabilidade, ajuda e compreensão ao longo deste percurso, mostrando sempre disponibilidade.

À Professora Doutora Manuela Matos, pelo apoio, disponibilidade, pela simpatia e estímulo dado ao longo da realização deste trabalho.

À equipa de investigação de Castelo Branco, nomeadamente, à Professora Doutora Ana Cristina Matos e ao Dr. Luís Figueira pela cedência das amostras que permitiram a realização deste trabalho e por toda a disponibilidade demonstrada.

Quero expressar também a minha gratidão pela simpatia e disponibilidade à D. Sónia Dias, D. Fátima Peixoto e D. Lurdes Campos, funcionárias do Laboratório de Microbiologia Médica. Um agradecimento especial à D. Fátima Fraga por toda a simpatia, carinho, atenção, apoio e ajuda prestada.

À Doutora Sandra Martins, pela simpatia, apoio, disponibilidade para transmitir todos os ensinamentos e pelo auxílio nas técnicas de genética molecular.

A todos os estagiários, mestrandos e doutorandos com quem tive o prazer de partilhar os laboratórios, em especial à Sofia Saraiva, que me acompanhou sempre ao longo deste trabalho, por toda a simpatia, companheirismo, disponibilidade e acima de tudo pela amizade.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta etapa da minha vida, por toda a ajuda e ânimo dados ao longo deste trabalho, pela confiança e otimismo.

Ao Luís, cujo apoio, carinho, amor, compreensão e incentivo me fazem acreditar que posso chegar sempre mais longe.

À minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã que estiveram sempre comigo, nos bons e maus momentos e que me apoiaram sempre em todas as decisões da minha vida, pelo seu amor e carinho incondicional.

A todos, muito obrigada!

Alguns dos resultados desta dissertação foram apresentados em Jornadas na forma de comunicação em painel: documentação em anexo.

## Resumo

Os fungos são microrganismos que convivem com o ser humano todos os dias. Podem ser encontrados praticamente em qualquer local do ambiente, inclusive no ar, onde as estruturas fúngicas têm a capacidade de desenvolver novas estruturas vegetativas e reprodutivas quando atingem o substrato adequado. Estes podem também ser encontrados no solo, água, plantas, animais e humanos. É importante compreender que a gravidade da infecção depende do tipo de fungo envolvido mas, principalmente, do estado imunológico do indivíduo.

Este trabalho consistiu na detecção de fungos filamentosos no pelo de animais, quer selvagens quer domésticos e, na mucosa nasal de humanos. No total, efetuou-se a colheita de 228 amostras: 101 pertencentes a animais selvagens, 73 amostras nasais de humanos e 54 amostras de animais domésticos. As amostras de pelo foram semeadas em meios de cultura específicos. A identificação fúngica das colónias foi efetuada com base nas características fenotípicas tanto a nível macroscópico como microscópico das colónias.

Os géneros fúngicos mais prevalentes em animais selvagens foram *Mucor*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Verificou-se também uma elevada percentagem de isolamento de fungos dermatófitos em sacarrabos (26,3%) e em raposas-vermelhas (5,9%). Nas amostras nasais os géneros mais prevalentes foram *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Os mesmos fungos, mas por ordem de prevalência diferente, foram isolados nos animais domésticos: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*. É também importante referir que foram isolados cinco fungos dermatófitos, todos do género *Microsporum*, em animais domésticos. Quatro dos cinco animais eram do género masculino e nenhum deles apresentava lesões. Através dos resultados obtidos verifica-se a importância da realização de rastreios, uma vez que permitem não só dar a conhecer a microbiota presente no pelo dos animais bem como minimizar os riscos de infeção.

*Talaromyces marneffe* foi identificado por técnicas microbiológicas em 7 das 228 amostras submetidas a este estudo: em três animais selvagens, três amostras nasais de humanos e num animal doméstico. Posteriormente todos estes isolados foram confirmados por PCR.

Os resultados obtidos por biologia molecular sugerem que esta técnica poderá ser aplicada para a confirmação do diagnóstico precoce da infeção causada por este fungo, uma vez que é possível obter resultados num curto período de tempo.

**Palavras-chave:** Fungos, dermatófitos, epidemiologia, PCR, *Talaromyces marneffe*

## Abstract

Fungi are organisms that live with humans every day. They can be found almost anywhere in the environment, even in the air, where the fungal structures have the capacity to develop new vegetative and reproductive structures when they reach the appropriate substrate. They can also be found in soil, water, plants, animals and humans. It is important to understand that the severity of the infection depends on the type of fungus involved but mainly the immune status of the individual.

This study consisted in the detection of filamentous fungi in the fur of animals, wild and domestic and, in the nasal mucosa of humans. Totally, 228 samples were collected: 101 belonged to wild animals, 73 nasal samples of humans and 54 samples of domestic animals. The collected samples were seeded into specific culture media. Fungal identification was made based on phenotypic characteristics of the colonies at the macroscopic and microscopic level.

The most prevalent genus in the wild animals were *Mucor*, *Penicillium* and *Aspergillus*. There was also found a high percentage of isolation of dermatophyte fungi in egyptian mongoose (26,3%) and in red foxes (5,9%). In the nasal samples the most prevalent genus were *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium* and *Aspergillus*. The same fungi, but in different order of prevalence, were isolated from domestic animals: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor* and *Aspergillus*. It's also important to note that five dermatophyte fungi were isolated, all of them belonging to the genus *Microsporum*, in domestic animals. Four of the five animals were male and none of them had skin lesions. The results obtained suggest the importance of conducting surveys, since they allow not only to let us know the mycobiota present in the fur of animals but also minimize the risk of infection.

*Talaromyces marneffe* was identified by microbiological techniques in 7 out of 228 samples subjected to this study: in three wild animals, three nasal samples from human and in a domestic animal. Subsequently all of these isolates were confirmed by PCR.

The results obtained by molecular biology suggest that this technique may be applied for the confirmation of early diagnosis of the infection caused by this fungus, since it is possible to obtain results in a short period of time.

**Key words:** Fungi, dermatophytes, epidemiology, PCR, *Talaromyces marneffe*

# Índice Geral

1. Introdução.....	1
1.1 Importância do estudo .....	1
1.2 Características gerais dos fungos.....	3
1.3 Estrutura .....	4
1.4 Fungos e a sua importância .....	5
1.5 Taxonomia fúngica.....	6
1.6 Fungos Dermatófitos .....	7
1.6.1 <i>Microsporum</i> .....	9
1.6.2 <i>Trichophyton</i> .....	9
1.6.3 <i>Epidermophyton</i> .....	10
1.7 Fungos filamentosos não queratinófilos .....	10
1.7.1 <i>Aspergillus</i> spp. ....	10
1.7.2 <i>Cladosporium</i> spp.....	11
1.7.3 <i>Mucor</i> spp. ....	12
1.7.4 <i>Penicillium</i> spp. ....	13
1.7.5 <i>Talaromyces marneffei</i> ( <i>Penicillium marneffei</i> ).....	14
1.8 Diagnóstico laboratorial .....	17
1.8.1 Diagnóstico microbiológico .....	17
1.8.2 Diagnóstico por técnicas moleculares .....	18
1.8.2.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	19
1.8.3 Técnicas de diagnóstico alternativas .....	20
2. Objetivos .....	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1 Colheita das amostras .....	22
3.2 Meios de Cultura .....	23
3.2.1 Potato Dextrose Agar (PDA).....	23
3.2.2 Dermathophyte Test Medium (DTM) .....	24
3.3 Isolamento das amostras.....	25
3.4 Isolamento dos fungos .....	26
3.5 Identificação dos fungos.....	27
3.5.1 Identificação macroscópica .....	27

3.5.2 Identificação microscópica .....	27
3.5.2.1 Método do Lactofenol com Azul de Algodão .....	28
3.5.3 Identificação de <i>T. marneffei</i> .....	29
3.5.3.1 Coloração Simples com Azul de Metileno .....	29
3.5.4 Conservação em água destilada esterilizada.....	30
3.5.5 Extração de DNA .....	31
3.5.6 Qualidade do DNA .....	32
3.5.7 Nested-PCR .....	33
3.6 Análise de dados.....	35
4. Resultados .....	36
4.1 Rastreamento da colonização nasal por fungos.....	36
4.1.1 Efeito do sexo na colonização nasal.....	37
4.1.2 Efeito da idade na colonização nasal.....	37
4.1.3 Relação entre alergias e outras doenças respiratórias e colonização nasal.....	38
4.1.4 Relação entre o convívio com animais e colonização nasal .....	39
4.2 Rastreamento da microbiota do pelo em cães e gatos .....	40
4.2.1 Isolamento em simultâneo em animais e humanos.....	42
4.3 Rastreamento da microbiota integumentária em animais selvagens .....	43
4.4 <i>Talaromyces marneffei</i> .....	47
4.5 Biologia molecular .....	48
4.5.1 DNA genómico.....	48
4.5.2 1ª Reação Nested-PCR .....	49
4.5.3 2ª Reação Nested-PCR .....	50
5. Discussão.....	51
6. Conclusão .....	61
7. Referências Bibliográficas.....	63
Anexos.....	75

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Processo de libertação das exoenzimas hidrolíticas para a absorção de produtos solúveis.....	3
<b>Figura 2.</b> Diferença estrutural entre uma hifa septada e asseptada. ....	4
<b>Figura 3.</b> Dermatófitos e sinais clínicos.....	8
<b>Figura 4.</b> Características macroscópicas e microscópicas do género <i>Aspergillus</i> . ...	11
<b>Figura 5.</b> Características macroscópicas e microscópicas do género <i>Cladosporium</i>	12
<b>Figura 6.</b> Características macroscópicas e microscópicas do género <i>Mucor</i> .....	13
<b>Figura 7.</b> Características macroscópicas e microscópicas do género <i>Penicillium</i> ....	14
<b>Figura 8.</b> Lesões cutâneas em indivíduos infetados com VIH e <i>T. marneffe</i> .....	16
<b>Figura 9.</b> Número de casos documentados de indivíduos não infetados com VIH mas com infeção por <i>T. marneffe</i> .....	16
<b>Figura 10.</b> Preparação do meio de cultura PDA .....	24
<b>Figura 11.</b> Frascos com DTM num suporte inclinado. ....	25
<b>Figura 12.</b> Processo de inoculação das amostras .....	26
<b>Figura 13.</b> Lâminas preparadas com o método do Lactofenol Azul de Algodão. ....	28
<b>Figura 14.</b> Imagem microscópica de <i>T. marneffe</i> na forma de levedura (x1000)....	30
<b>Figura 15.</b> Conservação do fungo em água destilada esterilizada .....	30
<b>Figura 16.</b> Técnica de eletroforese.....	34
<b>Figura 17.</b> Prevalência de crescimento fúngico de acordo com o sexo. ....	37
<b>Figura 18.</b> Prevalência de crescimento fúngico de acordo com a idade. ....	38
<b>Figura 19.</b> Prevalência de crescimento fúngico de acordo com a presença ou ausência de animais domésticos.....	40
<b>Figura 20.</b> Imagens microscópicas (x1000) dos dermatófitos isolados nos animais de companhia .....	41
<b>Figura 21.</b> Imagens macroscópicas dos géneros fúngicos mais isolados em animais de companhia .....	42
<b>Figura 22.</b> Imagens microscópicas (x1000) dos géneros fúngicos isolados simultaneamente em humanos e animais .....	42
<b>Figura 23.</b> Percentagens das diferentes espécies dos animais selvagens sujeitos ao estudo. ....	43
<b>Figura 24.</b> Características macroscópicas e microscópicas de <i>T. marneffe</i> . ....	47

<b>Figura 25.</b> Géis de DNA genómico.....	49
<b>Figura 26.</b> Gel da 1ª reação de Nested-PCR .....	49
<b>Figura 27.</b> Gel da 2ª reação de Nested-PCR. ....	50
<b>Figura 28.</b> Gel da repetição da 2ª reação de Nested-PCR.....	50

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> “Primers” utilizados e respectivas sequências. ....	33
<b>Tabela 2.</b> Quantidades dos componentes utilizados para a Mix da primeira reação. 33	
<b>Tabela 3.</b> Condições da primeira reação da Nested-PCR. ....	34
<b>Tabela 4.</b> Reagentes utilizados para a Mix da segunda reação. ....	35
<b>Tabela 5.</b> Condições da segunda reação da Nested-PCR. ....	35
<b>Tabela 6.</b> Prevalência dos gêneros fúngicos isolados a partir da mucosa nasal de 73 humanos. ....	36
<b>Tabela 7.</b> Frequência do isolamento fúngico em indivíduos saudáveis e alérgicos..	39
<b>Tabela 8.</b> Frequência do isolamento fúngico em cães e gatos. ....	41
<b>Tabela 9.</b> Prevalência dos diferentes gêneros fúngicos isolados nos 101 animais selvagens. ....	44
<b>Tabela 10.</b> Prevalência e distribuição da microbiota isolada relativamente às espécies de animais selvagens. ....	45
<b>Tabela 11.</b> Descrição das amostras submetidas a PCR. ....	48

## Lista de Abreviaturas

**BHI** - Brain Heart Infusion

**CRS** - Chronic Rhinosinusitis (Rinossinusite crónica)

**DNA** - Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

**DTM** - Dermatophyte Test Medium

**ELISA** - Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

**Map** - *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

**pb** - pares de bases

**PCR** - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

**PDA** - Potato Dextrose Agarose

**RNA** - Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

**rpm** - rotações por minuto

**SDA** - Saboraud Dextrose Agar

**TBE** - Tris-Borato-EDTA

**VIH** - Vírus da imunodeficiência humana

## **1. Introdução**

A micologia médica, ciência que tem como objetivo o estudo das micoses humanas e animais, desenvolveu-se com a descoberta e isolamento dos principais agentes etiológicos de micoses, como as dermatofitoses, candidíases, aspergiloses, criptococoses, histoplasmoses, entre outras (Prescott, 2002). Desde então, tem havido um contínuo progresso no conhecimento dos fungos patogênicos e do seu papel na etiologia das doenças infecciosas. Nos últimos 50 anos, a expansão do espectro das infecções fúngicas tem sido acompanhada pelo aumento da compreensão dos aspectos clínicos e patológicos das micoses, bem como, da ecologia e epidemiologia dos fungos patogênicos e oportunistas (Prata, 2007). Atualmente, as infecções graves são cada vez mais recorrentes e, provocadas por uma variedade cada vez maior de agentes patogênicos, de tal forma que, alguns autores consideram que não existem fungos não patogênicos, uma vez que, praticamente qualquer fungo pode causar uma micose com potencial de letalidade num indivíduo imunodeprimido (Anaissie *et al.*, 2009).

Este trabalho pretende avaliar a ocorrência de fungos filamentosos em pelos de animais selvagens e domésticos e na mucosa nasal de humanos. Assim, neste primeiro capítulo, são abordados os tópicos considerados mais importantes para a compreensão do Reino Fungi.

### **1.1 Importância do estudo**

Esta investigação apresenta uma elevada importância no que diz respeito à Saúde Pública e à saúde animal, uma vez que os fungos são ubiqüitários, isto é, encontram-se em todos os locais que possuam as condições ideais para o seu desenvolvimento, incluindo os seres humanos e os animais. Tanto os seres humanos como os animais, podem possuir no seu corpo fungos altamente patogênicos como é o caso dos dermatófitos, ou fungos que apenas causam doenças caso o indivíduo esteja imunodeprimido (Madigan *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao rastreio que foi efetuado ao nível dos animais selvagens, este é considerado bastante importante, uma vez que, de acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, este provavelmente será um rastreio pioneiro quer a nível nacional, quer a nível internacional. Todos os trabalhos publicados no âmbito da microbiologia, relativos a este tipo de animais referem outro tipo de investigação, que não um rastreio fúngico. Por outro lado, este

estudo serve também de alerta para o perigo do contacto entre determinadas classes como caçadores, veterinários, biólogos, ecologistas e, os animais. Os animais selvagens podem ser um reservatório de fungos com capacidade patogénica não devendo, por isso, os indivíduos imunodeprimidos praticar este tipo de atividade, principalmente, porque raramente são utilizados equipamentos de proteção individual, como luvas, batas e máscaras. Como não são tomadas as precauções necessárias para quem exerce este tipo de passatempo ou atividade, é altamente aconselhável que as pessoas imunologicamente debilitadas não a pratiquem.

Quanto ao rastreio fúngico em humanos, este estudo pretende fazer uma comparação entre indivíduos com e sem animais de estimação, mas também entre indivíduos com alergias e saudáveis. Sabe-se que os fungos ambientais, tanto do exterior como do interior das habitações, sendo estes últimos maioritariamente provenientes dos alimentos e do pelo dos animais de estimação, podem colonizar a cavidade nasal juntamente com o ar inalado, causando reações de hipersensibilidade em indivíduos atópicos. No entanto, não existem muitos estudos que façam a comparação entre a microbiota fúngica dos diferentes indivíduos, como a que vai ser realizada neste trabalho.

Considerando agora, a estreita convivência entre os seres humanos e animais de estimação, especialmente cães e gatos, verifica-se que este tipo de estudos é, não só extremamente interessante, bem como, muito importante, uma vez que poderemos estar perante doenças animais que também poderão afetar os seres humanos, isto é, zoonoses. A transmissão das doenças ocorre, principalmente, dos animais para indivíduos com o sistema imunitário debilitado, devendo ser tomadas algumas providências para uma eficaz terapia fúngica, uma vez que esta é muitas vezes de eficácia limitada neste tipo de indivíduos, resultando em falhas no tratamento, infeções crónicas e, pode ainda levar a valores inaceitáveis de mortalidade, morbidade e dos custos associados. Consequentemente, houve uma necessidade médica para o desenvolvimento de novos tratamentos e medidas preventivas de combate a doenças fúngicas, como por exemplo, vacinas seguras e eficazes. Contudo a profilaxia médica ainda se encontra em fase de investigação (Cassone e Casadevall, 2012).

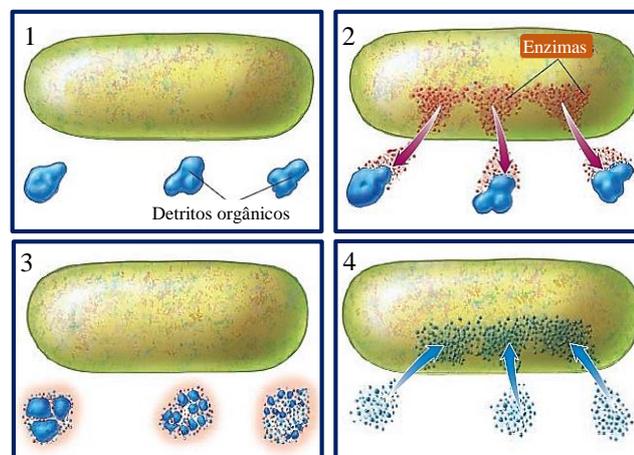
Assim, o ideal seria realizar rastreios necessários aos animais, de forma a saber se estes estão ou não infetados com fungos com potencial patogénico. No caso de apresentarem resultados positivos, deveria ser providenciado o tratamento antifúngico adequado, ou mesmo a profilaxia com vacinas e outras medidas de controlo e prevenção, principalmente, nos animais domésticos. O mesmo se aplica aos humanos, principalmente, se estes estiverem com o sistema imunitário comprometido.

## 1.2 Características gerais dos fungos

O Reino Fungi está repleto de organismos de elevada variedade e complexidade que sobreviveram na Terra durante cerca de 650 milhões de anos (Talaro e Chess, 2015). Sabe-se que estes crescem preferencialmente em habitats escuros e húmidos, mas, podem ser encontrados onde houver disponibilidade de matéria orgânica (Prescott, 2002; Prata, 2007). Quanto à sua distribuição na natureza, os fungos podem ser encontrados no solo, água, atmosfera, plantas, animais e no Homem, desde que neles encontrem as condições necessárias ao seu desenvolvimento (Prata, 2007; Misra *et al.*, 2015).

Os fungos apresentam parede celular rica em quitina e são desprovidos de clorofila (Pommerville, 2014; Delost, 2015). Devido a esta característica, não têm capacidade de produzir energia através da luz e do dióxido de carbono, ou seja, não são capazes de realizar fotossíntese. Podem ser haplóides ou diplóides e reproduzem-se de forma assexuada, sexuada ou parassexuada. Neste último tipo de reprodução ocorre plasmogamia e cariogamia entre estirpes da mesma espécie, sem que se verifique um verdadeiro ciclo sexuado, uma vez que não existem estruturas sexuais diferenciadas, nem se forma o zigoto. No entanto, a existência de duas fases, uma haplóide e uma diplóide, leva a que se designe este tipo de reprodução por parassexuada. Este tipo de reprodução ocorre exclusivamente nos fungos (Prata, 2007).

São organismos heterotróficos e geralmente são aeróbios (Prescott, 2002; Prata, 2007; Misra *et al.*, 2015). A maioria é saprófita, garantindo o aporte dos seus nutrientes a partir de matéria orgânica morta. Tal como muitas bactérias, os fungos libertam exoenzimas hidrolíticas que degradam os substratos externos sendo posteriormente possível, a absorção dos produtos solúveis (Figura 1) (Delost, 2015; Pepper *et al.*, 2015; Talaro e Chess, 2015).



**Figura 1.** Processo de libertação das exoenzimas hidrolíticas para a absorção de produtos solúveis (Adaptado de Talaro e Chess, 2015).

### 1.3 Estrutura

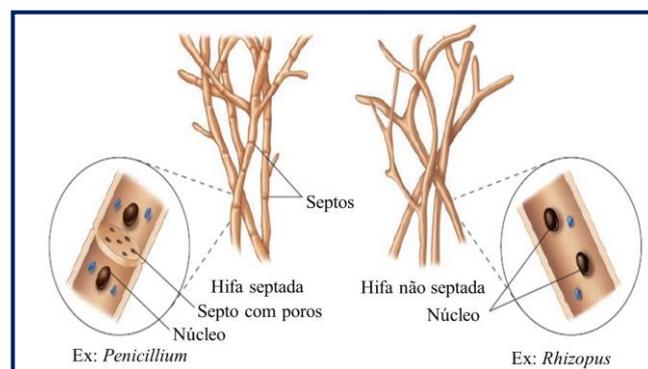
Os fungos constituem um grupo de organismos eucariotas em que o principal esterol encontrado na constituição das suas membranas é o ergosterol, que exerce funções semelhantes às do colesterol encontrado nas membranas das células animais (Kavanagh, 2011). Estes organismos podem surgir na forma unicelular (também designados de leveduriformes) ou na forma multicelular (filamentosa) (Kayser *et al.*, 2005; Deacon, 2006; Pommerville, 2014).

O órgão ou estrutura vegetativa de um fungo é designado de talo. Este varia em complexidade e tamanho, desde estruturas microscópicas unicelulares e multicelulares até estruturas macroscópicas (Prescott, 2002).

Enquanto nos fungos leveduriformes o talo é constituído por uma única célula, nos filamentosos é formado por hifas. Quando estas se desenvolvem originam uma outra estrutura denominada de micélio (Deacon, 2006; Prata, 2007; Tortora *et al.*, 2010; Richardson e Warnock, 2012; Pommerville, 2014; Pepper *et al.*, 2015).

As hifas podem apresentar duas tipologias distintas: septadas ou asseptadas (também designadas de cenocíticas) (Figura 2). Uma hifa diz-se septada quando o protoplasma é interrompido por septos, invaginações interiores da parede, compartimentando a hifa. Por sua vez, uma hifa diz-se asseptada quando o protoplasma se encontra de forma contínua, sem interrupções (Deacon, 2006; Tortora *et al.*, 2010; Kavanagh, 2011).

Alguns fungos podem apresentar dimorfismo, ou seja, o mesmo fungo pode apresentar-se sob a forma unicelular (leveduriforme) ou filamentosa. A alteração da morfologia ocorre por alteração de fatores ambientais, como a temperatura ou disponibilidade de nutrientes (Deacon, 2006; Pommerville, 2014; Pepper *et al.*, 2015). Por exemplo, alguns agentes patogénicos humanos e animais existem como formas de levedura mobilizados nos fluidos corporais, mas são capazes de formar pseudo-hifas para invadir os tecidos (Kavanagh, 2011).



**Figura 2.** Diferença estrutural entre uma hifa septada e asseptada (Adaptado de Talaro e Chess, 2015).

## 1.4 Fungos e a sua importância

O Reino Fungi, ou Eumycota (do grego: *eu*, verdadeiro e *mykes*, fungos) está repleto de organismos de grande variedade e complexidade (Prescott, 2002; Talaro e Chess, 2015).

No que diz respeito aos benefícios, desempenham um papel essencial na decomposição da matéria orgânica, formam associações estáveis com as raízes das plantas (micorrizas) e possuem um elevado potencial bioquímico para produzir grandes quantidades de antibióticos, álcool, ácidos orgânicos e vitaminas. Na área da alimentação, alguns fungos são usados para alterar a textura, melhorar o sabor e aumentar a digestibilidade de alimentos naturais ou processados. Alguns exemplos são os queijos azuis, molho de soja e carnes curadas (Prescott, 2002; Deacon, 2006; Bhatia e Ichhpujani, 2008; Anaissie *et al.*, 2009; Talaro e Chess, 2015).

Por outro lado, estes organismos também provocam vários malefícios, nomeadamente, ao nível da saúde. Apesar de se estimar existirem cerca de 1,5 milhões de fungos, poucos são os que são capazes de causar infeções em humanos saudáveis. Isto sugere que os mamíferos possuem complexos mecanismos de defesa contra os fungos e, mais importante ainda, que estes têm sido incapazes de desenvolver mecanismos patogénicos para contra-atacar essa resistência imunitária (Anaissie *et al.*, 2009; Madigan *et al.*, 2015).

Uma das doenças mais frequentes causadas por fungos são as alergias micogénicas. As doenças alérgicas são consideradas uma epidemia dos séculos XX e XXI e estima-se que afetem mais de 30% da população em países industrializados, estando este número ainda em expansão (Cramer *et al.*, 2014). Estima-se também que mais de 80 géneros de fungos sejam capazes de induzir alergias de tipo I em indivíduos suscetíveis (Simon-Nobbe *et al.*, 2008). Sempre que os indivíduos inspiram, os esporos dos fungos são inalados pelo trato respiratório juntamente com o ar. Estes esporos contêm potentes substâncias alergénicas para as quais, indivíduos suscetíveis podem manifestar grandes reações de hipersensibilidade. Dependendo da localização da reação, pode assumir a forma de rinite alérgica, asma brônquica ou alveolite alérgica (Kayser *et al.*, 2005).

Outro exemplo são as micotoxicoses, às quais os humanos podem estar expostos de três formas diferentes: através da ingestão de comida contaminada, por contacto com a pele e consequente absorção ou, por inalação das micotoxinas (Anaissie *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2014; Pommerville, 2014). A mais comum é a ingestão e dependendo da micotoxina podem ser causados vários efeitos, quer na síntese de proteínas, DNA ou RNA, quer na disrupção das membranas celulares, o que pode levar à morte celular. Sabe-se que alguns fungos produzem

micotoxinas, sendo os géneros mais relevantes *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. (Anaissie *et al.*, 2009). As micotoxinas mais conhecidas são as aflatoxinas produzidas em grande parte pelas espécies de *Aspergillus*. Este tipo de toxinas é, evidentemente, um problema mais representativo em países subdesenvolvidos, tendo sido reportados casos de carcinomas hepáticos primários na África e no sudeste da Ásia e até casos de morte devido a toxicoses agudas por aflatoxinas na Índia (Kayser *et al.*, 2005; Anaissie *et al.*, 2009).

Para além das alergias fúngicas e micotoxicoses, as infeções fúngicas são de longe as doenças fúngicas mais frequentes (Kayser *et al.*, 2005). O primeiro passo para a ocorrência de uma infeção fúngica é a introdução do agente patogénico no hospedeiro. A infeção pode limitar-se às camadas superficiais ou tornar-se sistémica, disseminando-se, através da circulação sanguínea (Talaro e Chess, 2015). Clinicamente, as micoses podem ser classificadas em cinco categorias, de acordo com a sua localização e apresentação: micoses sistémicas, cutâneas, subcutâneas, superficiais e micoses oportunistas (Tortora *et al.*, 2010; Talaro e Chess, 2015). Uma mesma espécie ou grupo de fungos pode ser responsável por infeções em diferentes localizações e com níveis variáveis de gravidade (Prata, 2007).

## **1.5 Taxonomia fúngica**

Muitas vezes, é difícil para os microbiologistas atribuir esquemas de classificação lógicos e úteis aos microrganismos, uma vez que estes nem sempre se encaixam perfeitamente nas diferentes categorias e os fungos não são exceção. No entanto, desde o final da década de 1990, o conhecimento sobre a sistemática e evolução de fungos passou por uma mudança revolucionária impulsionada pelo aumento da análise dos dados moleculares e filogenéticos e auxiliada pela redução do custo da sequenciação molecular (Talaro e Chess, 2015).

Segundo Hubregtse (2016) a classificação revista do Reino Fungi apresenta na sua constituição 8 filos. Sete deles compreendem o grupo de fungos que tem paredes celulares ricas em quitina, nomeadamente os filos Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Zygomycota, Blastocladiomycota, Chitridiomycota e Neocallimastigomycota. Existe também um outro grupo que representa fungos que não possuem paredes celulares ricas em quitina, o filo Cryptomycota. Neste trabalho, de acordo com o objetivo do estudo apenas irão ser abordados os fungos pertencentes aos filos Zygomycota e Ascomycota.

Os fungos pertencentes ao filo Zygomycota são maioritariamente terrestres, sendo saprófitas, parasitas ou predadores de protozoários ou nemátodes (Prata, 2007). Os fungos do filo Zygomycota caracterizam-se por apresentarem hifas largas e cenocíticas. Este filo contém importantes fungos patogénicos para o Homem: *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Conidiobolus* e *Basidiobolus* (Tortora *et al.*, 2010; Richardson e Warnock, 2012; Pommerville, 2014; Talaro e Chess, 2015).

O filo Ascomycota, é, de longe, o maior filo, uma vez que inclui alguns fungos filamentosos e algumas leveduras. Os ascomicetes são na sua maioria terrestres, mas existem também algumas formas aquáticas. Muitos são parasitas de plantas e animais, enquanto outros são saprófitas, vivendo no solo ou em detritos vegetais (Prata, 2007). Este filo também contém muitos dos géneros considerados patogénicos para o ser humano: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Microsporum* (Tortora *et al.*, 2010; Talaro e Chess, 2015).

## 1.6 Fungos Dermatófitos

Os fungos dermatófitos são fungos filamentosos queratinófilos, isto é, com capacidade para degradar a queratina, uma proteína insolúvel, obtendo assim nutrientes. A queratina pode ser encontrada em vários locais, incluindo o corpo humano, nomeadamente, na pele, unhas e cabelo (Liu, 2011; Sykes, 2014). Quando os organismos crescem no hospedeiro, não costumam invadir os tecidos, uma vez que apenas colonizam as camadas queratinizadas mais superficiais da pele (Prata, 2007).

A doença conhecida por tinea ou dermatofitose (Figura 4 – A e B) é o resultado da reação do hospedeiro com as enzimas libertadas pelo fungo, durante o processo de degradação. Os dermatófitos são os únicos fungos que desenvolvem uma dependência da infeção do ser humano ou animais, para a sobrevivência da espécie, pelo que, conseqüentemente, estes fungos estão entre os mais comuns agentes de infeção de humanos (Prata, 2007).

Este grupo é constituído por inúmeras espécies agrupadas em três géneros, que podem ser diferenciados pela forma e disposição dos micro e/ou macroconídios: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (Kayser *et al.*, 2005; Valdigem *et al.*, 2006; Prata, 2007; Almeida, 2012; Sykes, 2014). Os três géneros de dermatófitos diferem na sua distribuição geográfica, na capacidade de infetar o ser humano em diferentes locais do corpo e no grau de resposta da infeção provocada no ser humano e nos animais (Goering *et al.*, 2013). Com base

no seu habitat natural e na sua associação com os hospedeiros, os dermatófitos podem ainda ser agrupados em três grupos: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (Lemsaddek, 2008).

Os dermatófitos que habitam principalmente no solo e matéria orgânica morta são denominados de geofílicos. A exposição ao solo contaminado constitui a maior fonte de infecção de humanos e animais. Por estarem associadas à decomposição de material queratinizado presente no solo, as espécies geofílicas são consideradas as ancestrais dos dermatófitos patogénicos (Lemsaddek, 2008; Mahon *et al.*, 2011). Os zoofílicos estão tipicamente adaptados para viver na pele e no pelo dos animais, uma vez que, passaram gradualmente da vida saprofítica no solo ao parasitismo de animais. A infecção de humanos por espécies zoofílicas ocorre quando existe um contacto direto com animais infetados ou, de uma forma indireta, quando ocorre um contato com objetos inanimados associados ao material queratinoso de animais infetados (Lemsaddek, 2008; Mahon *et al.*, 2011). A adaptação das espécies zoofílicas ao parasitismo de humanos permitiu a formação do grupo de espécies antropofílicas. Embora sejam encontrados quase sempre como agentes de doenças humanas, as infecções que provocam raramente são inflamatórias. A transmissão entre humanos pode ocorrer por contacto direto entre pessoas ou por contacto indireto, como por exemplo, devido à partilha de bens pessoais como, escovas, toalhas e chapéus (Lemsaddek, 2008; Mahon *et al.*, 2011).

De uma forma geral, os fungos dermatófitos crescem em meios nutricionais após 5 a 14 dias, a temperaturas entre os 25 e 30°C, com uma aparência semelhante ao algodão. Normalmente apresentam cor branca (Figura 3 - C), sendo também possível a observação deste tipo de fungos com outras cores. Uma vez que estas características são variáveis, estes serão também os critérios menos confiáveis para a identificação, sendo, por isso, indispensável a realização de uma lâmina para observação ao microscópio (Quinn *et al.*, 1994; Kayser *et al.*, 2005; Sykes, 2014).



**Figura 3.** A e B - Sinais clínicos de dermatofitose; C - Dermatofito em cultura (Adaptado de Sykes, 2014).

### 1.6.1 *Microsporium*

O género *Microsporium* caracteriza-se por possuir macroconídios fusiformes ou em forma de lança, com paredes espessas e, salvo raras exceções, com a superfície externa rugosa ou espiculada, pelo menos na extremidade distal. Estes, dependendo das espécies, podem possuir entre 1 a 15 septos. Podem também observar-se microconídios, micélio, corpos nodulares e clamidósporos. As colónias apresentam normalmente uma tonalidade clara, variável entre o branco e o castanho (Prata, 2007; Ellis, 2016).

As espécies do género *Microsporium* infetam principalmente a pele, pelo e o cabelo, e mais raramente as unhas. Este género é conhecido por causar doenças como a tinha do couro cabeludo (*tinea capitis*) e a tinha do corpo (*tinea corporis*) (Prata, 2007).

São conhecidas várias espécies deste género, no entanto as espécies mais comuns são: *M. audouinii*, *M. canis*, *M. cookei*, *M. gallinae*, *M. gypseum* e *M. persicolor* (Ellis, 2016).

### 1.6.2 *Trichophyton*

O género *Trichophyton* caracteriza-se por produzir numerosos microconídios que podem possuir diferentes morfologias, desde esféricos a alongados. Os macroconídios, mais raros e em forma de charuto, geralmente, apresentam menos de quatro septos. Apresentam também paredes lisas e finas, sendo esta a característica primordial para a distinção entre este género e o género *Microsporium* (Prata, 2007). Os macroconídios por vezes podem ser difíceis de obter quando se utilizam os meios habituais, sendo necessário por vezes, realizar testes bioquímicos, como por exemplo, o teste de produção de urease, para se proceder à identificação dos isolados ao nível de espécie (Prata, 2007; Ellis, 2016).

As espécies de *Trichophyton* infetam a pele, pelo, o cabelo e as unhas, podendo causar inúmeras doenças, como por exemplo, tinha da barba (*tinea barbae*), tinha do couro cabeludo (*tinea capitis*), tinha do corpo (*tinea corporis*), tinha das virilhas (*tinea cruris*), tinha das mãos (*tinea manuum*), tinha dos pés (*tinea pedis*) e onicomicose (*tinea unguium*) (Prata, 2007).

Algumas das espécies mais comuns são: *T. equinum*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. terrestre*, *T. tonsurans* (Ellis, 2016).

### 1.6.3 *Epidermophyton*

O género *Epidermophyton* caracteriza-se pela ausência de microconídios e por possuir macroconídios muito largos com extremidades distais arredondadas, paredes lisas e, geralmente, com menos de 10 septos. Até ao momento apenas foi isolado em medicina humana (Prata, 2007).

Este género apresenta apenas duas espécies conhecidas, *E. floccosum* e *E. stockdale*. Até há pouco tempo atrás apenas a primeira era considerada patogénica, no entanto, Ghosh *et al.*, (2014) reportou o isolamento de *E. stockdale* em pacientes com onicomicose (*tinea unguium*) e com tinha do corpo (*tinea corporis*). *E. floccosum* é uma espécie com distribuição mundial que habitualmente provoca tinha das virilhas (*tinea cruris*), tinha dos pés (*tinea pedis*), tinha do corpo (*tinea corporis*) e onicomicoses (*tinea unguium*) (Prata, 2007; Ellis, 2016).

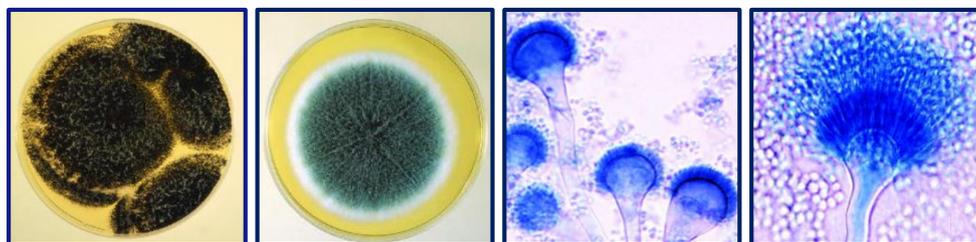
## 1.7 Fungos filamentosos não queratinófilos

### 1.7.1 *Aspergillus* spp.

São conhecidas mais de 190 espécies de *Aspergillus*, sendo que a sua maioria é saprófita, não apresentando riscos para a saúde humana e animal (Markey *et al.*, 2013). No entanto, algumas das espécies deste género podem provocar endoftalmite e aspergilose podendo esta ser séptica, do trato respiratório ou do sistema nervoso central (Kayser *et al.*, 2005). A espécie *A. flavus* é frequentemente associada a aspergilose invasiva, encontrada em pacientes imunodeprimidos e em infeções dos seios paranasais. *A. fumigatus* é um importante agente patogénico humano e é a causa mais comum de todas as formas de aspergilose quer invasiva, quer não invasiva. *A. niger* é uma das espécies mais comuns e facilmente identificáveis do género *Aspergillus* estando também associado com a aspergilose pulmonar invasiva. É também, muitas vezes, um agente causador de aspergiloma e, é o causador mais frequente de otomicose (Hospenthal e Rinaldi, 2015; Ellis, 2016). Em termos de taxonomia, este género está inserido no filo Ascomycota (Markey *et al.*, 2013).

Os fungos deste género têm um crescimento geralmente rápido, podendo ocorrer em apenas 3 dias (Prata, 2007). Pela visualização da colónia verifica-se que a superfície é inicialmente branca, ficando depois com tons amarelos, verdes, castanhos ou pretos,

dependendo da espécie (Figura 4 – A e B). A textura é pulverulenta, aveludada ou algodoadada consoante a maior ou menor produção de esporos (Quinn *et al.*, 1994; Prata, 2007; Ellis, 2016). Microscopicamente podem observar-se hifas hialinas e septadas com ramificação dicotômica. Os conidióforos surgem a partir de uma célula basal e dão origem a uma vesícula na sua extremidade (Figura 4). Dependendo da espécie, podem observar-se fiálides que surgem diretamente da vesícula (unisseriadas) (Figura 4 – C) ou que surgem a partir da métula (estrutura que se encontra entre a vesícula e as fiálides) designando-se bisseriadas (Figura 4 – D). A sua disposição em redor da vesícula, também é um forte indicador da espécie, isto é, se as fiálides se dispõem por toda a vesícula ou apenas numa certa porção da mesma. Os conídios por sua vez são redondos (2-5  $\mu\text{m}$ ) e constituem longas cadeias (Liu, 2011).



**Figura 4.** Características macroscópicas e microscópicas do género *Aspergillus*. **A** - Características macroscópicas de *A. niger* (Adaptado de Markey *et al.*, 2013). **B** - Características macroscópicas de *A. fumigatus* (Adaptado de Markey *et al.*, 2013). **C** - Características microscópicas de *A. fumigatus* (Adaptado de Ellis, 2016). **D** - Características microscópicas de *A. terreus* (Adaptado de Ellis, 2016).

### 1.7.2 *Cladosporium* spp.

O género *Cladosporium*, inclui mais de 500 espécies e é dos géneros mais comumente isolados, principalmente em estudos relativos à microbiota anemófila (Boss e Day, 2001; Pitt e Hocking, 2009).

Este género pode provocar reações de hipersensibilidade em indivíduos suscetíveis se estes forem continuamente expostos aos esporos. Assim, o género *Cladosporium*, um dos géneros mais comumente isolados do ar, pode ser considerado um potente alergénio (Carlile *et al.*, 2001; Bhatia e Ichhpujani, 2008). Pode também provocar cromoblastomicose, uma infeção de longa duração, caracterizada pelo aparecimento de nódulos no local do trauma (Madigan *et al.*, 2015). Esta infeção pode aparecer em qualquer local do corpo, ocorrendo a sua disseminação, geralmente, através do sistema linfático (Warrell *et al.*, 2005).

As colônias apresentam um crescimento extremamente lento, cerca de 7 dias, tendo uma coloração entre o verde escuro e o preto (Figura 5 - A) (Grillot, 1996; Ellis, 2016). Microscopicamente possuem conidióforos eretos, normalmente apenas ramificados na região apical (Ellis, 2016). Os esporos têm geralmente “cicatrices” distintas em ambas as extremidades, onde eles estão ligados, tanto ao esporo numa extremidade como ao conidióforo na outra, sendo designados de células escudo (*shield cells*) (Bhatia e Ichhpujani, 2008). Embora sejam muitas vezes denominados de esporos unicelulares, estes são frequentemente observados com um único septo transversal ou com vários septos transversais (Figura 5 – B e C). O seu comprimento varia entre 4 a 20 µm (Boss e Day, 2001).



**Figura 5.** Características macroscópicas e microscópicas do género *Cladosporium*. **A** - Características macroscópicas de *Cladosporium* sp. (Adaptado de Grillot, 1996). **B** - Características microscópicas de *Cladosporium* sp. (Adaptado de Grillot, 1996). **C** - Características microscópicas de *Cladosporium* sp. (Adaptado de Ellis, 2016).

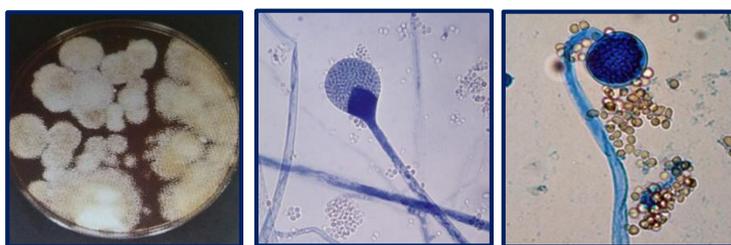
### 1.7.3 *Mucor* spp.

*Mucor* contém cerca de 50 espécies conhecidas e pertence à classe dos Zigomicetes, fazendo parte da ordem dos *Mucorales*. Esta ordem é conhecida por causar um espectro de doenças predominantemente angioinvasivas em pacientes imunodeprimidos (Marques *et al.*, 2010; Mignogna *et al.*, 2011). Dentro dos *Mucorales*, *Rhizopus* é o género que mais frequentemente causa doença em humanos, enquanto *Mucor* está associado a menos de 20% dos casos (Berger, 2016).

Este género é ubíquo no ambiente e pode ser encontrado no solo e na matéria em decomposição. Os esporos são facilmente transportados por via aérea, o que pode causar a contaminação das culturas em laboratório, sendo assim importante relacionar o crescimento da cultura com a história clínica do paciente para definir se o fungo deve ou não ser considerado a causa da doença. A infeção ocorre por ingestão ou inalação de esporos, sendo que neste ultimo caso a inalação pode causar doença nas vias respiratórias superiores e inferiores de indivíduos imunodeprimidos (Marques *et al.*, 2010; Berger, 2016).

*Mucor* pode ainda causar mucormicose, uma infecção rara para indivíduos saudáveis, mas, no entanto, com taxas de mortalidade bastante elevadas para indivíduos imunodeprimidos, apesar dos avanços no seu diagnóstico e tratamento (Kameswaran e Raghunandhan, 2009). As manifestações clínicas são variáveis e podem se manifestar por comprometimento rinocerebral, com frequência de 44% a 49% dos casos relatados, comprometimento cutâneo primário localizado ou generalizado (10% a 19%), pulmonar (10% a 11%), disseminado (6% a 11%) e gastrointestinal (2% a 11%) (Marques *et al.*, 2010).

As colônias deste género desenvolvem-se rapidamente, com uma textura macia e são facilmente identificados graças à coloração branca (Figura 6 - A), que se torna cinzenta, com o desenvolvimento de esporângios (Quinn *et al.*, 1994; Ellis, 2016). Microscopicamente observam-se hifas largas, com 6-15 µm de diâmetro e quase sem septos. Os esporangióforos são longos e ramificados, suportando na extremidade um esporângio redondo, com dimensões entre 50 e 300 µm de diâmetro (Figura 6 – B e C). Quando a parede do esporângio se rompe, são libertados esporos de grandes dimensões (4 a 8 µm de diâmetro), com uma estrutura globular ou elíptica e revela-se a columela (Prata, 2007; Ellis, 2016).



**Figura 6.** Características macroscópicas e microscópicas do género *Mucor*. **A** - Características macroscópicas de uma colónia jovem de *Mucor* sp. (Adaptado de Grillot, 1996). **B** - Características microscópicas de *Mucor* sp. (Adaptado de Berger, 2016). **C** - Características microscópicas de *Mucor circinelloides* (Adaptado de Ellis, 2016).

#### 1.7.4 *Penicillium* spp.

Mais de 200 espécies do género *Penicillium* são conhecidas, sendo muitas delas capazes de infetar indivíduos imunodeprimidos (Anaissie *et al.*, 2009; Kauffman *et al.*, 2011). De entre os fungos hialinos oportunistas, causadores de hialohifomicose, o género *Penicillium*, mostrou ser capaz de comprometer o sistema nervoso central (Anaissie *et al.*, 2009). Um estudo realizado por Huang e Harris (1963), abordou um caso de um paciente com leucemia, no qual encontraram peniciliose cerebral e pulmonar com invasão vascular e enfarte do miocárdio. Este género pode também causar doenças como otomicoses, infeções pulmonares, endoftalmites e

endocardites (Anaissie *et al.*, 2009; Ellis, 2016). É também um potencial produtor de micotoxinas, entre as quais, a aflatoxina B1, que é considerada a aflatoxina mais tóxica, estando muitas vezes relacionada com casos de carcinomas hepatocelulares (Ilic *et al.*, 2010; Ellis, 2016).

As colónias deste género apresentam crescimento rápido, ocorrendo geralmente em cerca de 4 dias. No que diz respeito à sua coloração, a superfície é inicialmente branca, tornando-se depois pulverulenta, de cor geralmente verde (Figura 7-A). O reverso é normalmente branco, mas pode ser vermelho ou castanho (Prata, 2007; Anaissie *et al.*, 2009; Ellis, 2016). Microscopicamente é possível observarem-se hifas septadas, com conidióforos ramificados ou não ramificados, dependendo das espécies. Os conidióforos podem apresentar segundas ramificações, designadas por métulas. Inseridas nestas, estão as fiálides, que tal como no género *Aspergillus*, suportam cadeias de conídios redondos, lisos ou rugosos (2,5-5 µm) (Figura 7 - B) (Prata, 2007).



**Figura 7.** Características macroscópicas e microscópicas do género *Penicillium*. **A** - Características macroscópicas de *Penicillium* sp. (Adaptado de Ellis, 2016). **B** - Características microscópicas de *Penicillium* sp. (Adaptado de Ellis, 2016).

### 1.7.5 *Talaromyces marneffei* (*Penicillium marneffei*)

*Penicillium marneffei* parece ser a única espécie do género *Penicillium* capaz de provocar doenças quer em seres humanos saudáveis quer em seres humanos imunodeprimidos (Anaissie *et al.*, 2009). Neste momento, devido aos novos desenvolvimentos na área da taxonomia, passou a ser designado por *Talaromyces marneffei* (Samson *et al.*, 2011), estando agora incluído no género *Talaromyces* com o qual possui diversos fatores de virulência em comum (de Hoog *et al.*, 2015).

Este é um fungo que apresenta dimorfismo térmico, isto é, cresce na forma de fungo filamentoso à temperatura de 25°C e na forma de levedura a 37°C (Pongsunk *et al.*, 2005; Vanittanakom *et al.*, 2006; Dankai *et al.*, 2015). O reservatório natural, o modo de transmissão

e o modo de infecção de *T. marneffe* ainda não são conhecidos. Até ao momento, os únicos reservatórios naturais conhecidos são os ratos-de-bambu *Rhizomys* e *Cannomys* spp. (Kayser *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2011) e os humanos (Devi *et al.*, 2009). Segundo Chaiwun *et al.* (2011) os cães também poderão ser um potencial reservatório deste agente patogénico. Estudos de Nor-Hayati *et al.* (2012) indicaram que este pode ser isolado do solo e, raramente, de outras fontes ambientais. As atividades praticadas durante os períodos mais chuvosos foram também associadas a um maior risco de exposição nos países endémicos (Wu *et al.*, 2008; Nor-Hayati *et al.*, 2012). Segundo os mesmos autores, existe uma forte possibilidade de os humanos serem infetados através da inalação dos esporos do agente infeccioso e muito raramente por contacto direto com o animal. Liu *et al.* (2013) também postularam que a via de transmissão não é totalmente clara, mas existe uma grande hipótese de o hospedeiro ser infetado por inalação dos esporos de um reservatório contaminado e, posteriormente, este se disseminar para outros órgãos por disseminação hematogénica. Para além disso, pensa-se que a sua natureza dimórfica contribui para a sua patogenicidade, isto é, a conversão para a fase de levedura dentro do hospedeiro estará relacionada com a progressão da doença.

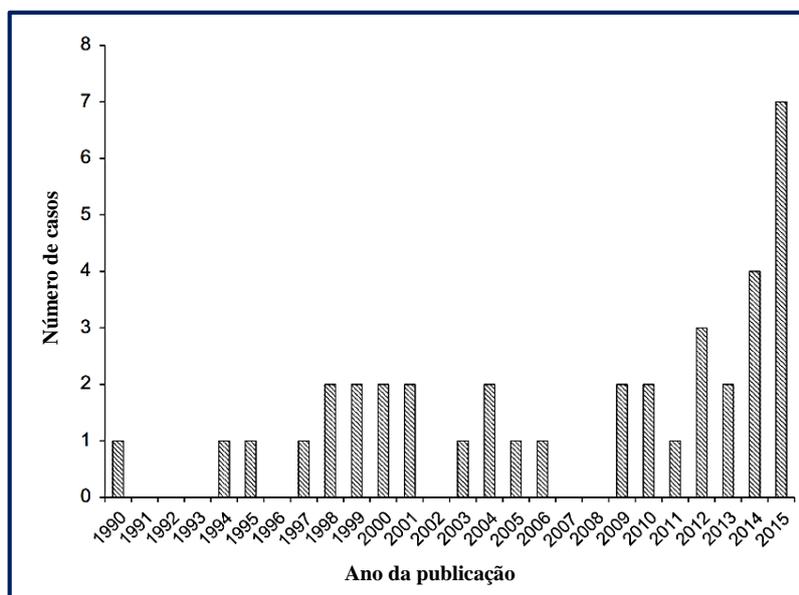
Este fungo pode provocar infeções disseminadas e progressivas especialmente pacientes infetados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Chaiwun *et al.*, 2011; Dahiya *et al.*, 2012, Seok *et al.*, 2015; Talaro e Chess, 2015). Os casos reportados ocorreram maioritariamente no sudeste asiático, nomeadamente na Tailândia, China, Vietnam, Taiwan e Singapura, havendo também já alguns casos reportados na Índia (Xiang *et al.*, 2015). No norte da Tailândia, a infecção por *T. marneffe* é a terceira infecção oportunista mais comum em indivíduos infetados pelo VIH (Mandell e Diamond, 2000). No entanto, devido à migração intensa, casos de infecção devido a *T. marneffe* fora desta área geográfica têm sido identificados em pessoas que viajaram para essas regiões (Sirisanthana, 2001).

No que diz respeito aos sinais clínicos, vários autores relataram nos seus estudos que os seus pacientes apresentavam sintomas não específicos, tais como, febre, mal-estar, anemia, hepatomegalia, linfadenopatia, perda de apetite, diarreia, esplenomegalia e perda de peso. No entanto este não é o diagnóstico de *T. marneffe* uma vez que estes são os sintomas subjacentes ao estado de imunossupressão, provavelmente devido a uma infecção por VIH. Segundo estes mesmos autores, a característica primordial de uma infecção por *T. marneffe* é a lesão cutânea caracterizada por lesões papulosas umbilicadas com necrose central (Figura 8) (Varghese *et al.*, 2004; Maniar *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Baradkar *et al.*, 2009; Nor-Hayati *et al.*, 2012; Seok *et al.*, 2015; Chan *et al.*, 2016).



**Figura 8.** Lesões cutâneas em indivíduos infetados com VIH e *T. marneffeii* (Adaptado de Mandell e Diamond, 2000).

Segundo a bibliografia, desde 1990 começaram a surgir alguns casos de pessoas que não se encontravam infetadas com VIH mas apresentavam infeção por *T. marneffeii* (Figura 9). Estes indivíduos encontravam-se imunodeprimidos, todavia não apresentavam a infeção à qual este fungo é sempre associado, o VIH. Assim, apesar de historicamente *T. marneffeii* e VIH aparentarem estar sempre associados, nos últimos anos com o aumento da melhoria dos tratamentos retrovirais e um maior alerta preventivo em alguns países onde o fungo é endémico, o número de casos com penicilioses tem diminuído entre os indivíduos com VIH, aumentando, por sua vez, em indivíduos imunodeprimidos com outras patologias (Chan *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Número de casos documentados de indivíduos não infetados com VIH mas com infeção por *T. marneffeii* (Adaptado de Chan *et al.*, 2016).

É ainda importante referir que este fungo cumpre os postulados documentados por Koch (1882) há mais de cento e trinta anos, mas que, no entanto, continuam a ser válidos para todos os investigadores, principalmente, na área de microbiologia. Segundo Koch, para se considerar que o agente suspeito é o causador da infeção tem que seguir quatro princípios fundamentais: deve ser encontrado em todos os casos de doença, deve ser isolado do individuo infetado e cultivado em cultura pura, a cultura pura do agente deve reproduzir a doença específica quando inoculada num animal normal, saudável e suscetível e por fim, este mesmo microrganismo deve ser recuperado do hospedeiro infetado experimentalmente. Segundo Chan *et al.* (2016) o primeiro caso de infeção por *T. marneffe* ocorreu em 1959. Um investigador acidentalmente inoculou este fungo patogénico no seu próprio dedo enquanto realizava experiências num rato. No local de inoculação foi possível observar pequenos nódulos, típicos da infeção por *T. marneffe*.

## **1.8 Diagnóstico laboratorial**

### **1.8.1 Diagnóstico microbiológico**

A utilização de um meio de cultura adequado é um dos requisitos que deve ser sempre cumprido em laboratório. Um meio ideal deve proporcionar não só o crescimento adequado, mas o melhor crescimento possível de modo a permitir que os fungos cresçam sem restrição e expressem todos os seus fenótipos (Meletiadiis *et al.*, 2001). A recuperação dos fungos do material clínico depende da obtenção de uma amostra clínica adequada e da utilização dos métodos de cultura que permitam a recuperação de organismos presentes (Murray *et al.*, 2015).

A escolha de um meio de cultura depende no tipo de microrganismo que se pretende semear tendo em consideração os requisitos nutricionais do mesmo. Tendo em conta a consistência, os meios de cultura podem ser classificados em líquidos, semi-sólidos ou sólidos (Sinha, 2014). Tendo em conta a composição, estes podem ser preparados através de componentes naturais, sintéticos ou semi-sintéticos (Murray *et al.*, 2015).

Os requisitos essenciais para o crescimento fúngico incluem fontes de carbono e azoto, vitaminas, minerais, ar e água. Não existe um meio no qual haja crescimento de todos os fungos. A maioria pode ser semeada em meios ricos em açúcares, no entanto, meios com menos

nutrientes são também bastante utilizados quando se pretende obter esporulação (Kirk *et al.*, 2008).

Segundo Murray *et al.* (2015) os meios de cultura podem ser subdivididos em quatro categorias gerais: meios enriquecidos não seletivos, meios seletivos, meios diferenciais e meios especializados. O meio de cultura mais utilizado para o isolamento dos fungos é o meio Sabouraud Dextrose Agar<sup>®</sup> (SDA), um meio enriquecido não seletivo. As características principais deste meio são o pH ácido (pH  $5,8 \pm 0,2$ ) e seu elevado teor em glicose. Todavia, o meio não é totalmente um impedimento para bactérias, e por essa razão, deve ser tornado num meio seletivo, adicionando antibióticos quando se pretender apenas o isolamento fúngico. Outro meio bastante usado é o Potato Dextrose Agar<sup>®</sup>, um meio que permite o crescimento de todos os gêneros fúngicos. Comparativamente com o SDA, verifica-se um pH semelhante (pH  $5,6 \pm 0,2$ ), no entanto nutricionalmente é considerado ligeiramente mais pobre, induzindo à esporulação dos fungos. Para o isolamento de dermatófitos é utilizado maioritariamente o Dermatophyte Test Medium<sup>®</sup> (pH  $5,5 \pm 0,2$ ). Este meio caracteriza-se por possuir inibidores de bactérias, um inibidor de fungos saprófitas e um indicador de pH (Sykes, 2014).

As temperaturas de incubação afetam o crescimento fúngico e, portanto, podem também afetar os gêneros de fungos em desenvolvimento nas placas de Petri. Os protocolos de isolamento recomendam a incubação de fungos filamentosos à temperatura ambiente ou a 25°C, uma vez que a estas temperaturas a maioria das colónias desenvolvem-se dentro de 2 a 10 dias (Mueller *et al.*, 2004). No caso de se efetuar isolamento de *T. marneffe* as colónias devem ser semeadas em Brain Heart Infusion (BHI), um meio enriquecido onde crescem quase todos os fungos e incubadas a 37°C para que haja conversão para a fase leveduriforme (Vanittanakom *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2010; McClatchey, 2002 e Ellis 2016). Para a coloração da lâmina pode utilizar-se uma coloração simples com azul de metileno ou uma coloração diferencial, a coloração de Gram (Mohan, 2009; SENAI-SP, 2015).

### **1.8.2 Diagnóstico por técnicas moleculares**

Em meados do século XX, surgiram na área da microbiologia, estudos relacionados com as propriedades genéticas de microrganismos. A partir desses trabalhos centrados na genética microbiana, os campos da biologia molecular, da engenharia genética e da genómica têm sido intensamente desenvolvidos. As tecnologias moleculares têm revolucionado as

ciências da vida e têm originado novas ferramentas experimentais que procuram solucionar os problemas mais complexos da biologia. Hoje em dia, muitos dos progressos realizados em microbiologia devem-se à genômica, ao mapeamento, sequenciação e análise de genomas (Madigan *et al.*, 2015).

A biologia molecular inclui variadas técnicas e testes que permitem relacionar diferentes áreas como a microbiologia, a bioquímica e a genética. Neste trabalho foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR), uma técnica que permitiu uma grande evolução no conhecimento nas diferentes áreas da biologia. É altamente sensível e específica, obtendo resultados a partir de quantidades mínimas de DNA, sendo amplamente utilizada na ciência forense, podendo também ser aplicada para a identificação de microrganismos (Talaro e Chess, 2015). A aplicação da PCR como técnica de diagnóstico também é considerada, visto ser possível obter-se o resultado em poucas horas, comparando com as técnicas de cultura tradicionais que podem demorar dias ou até mesmo semanas (Vanittanakom *et al.*, 2002; Talaro e Chess, 2015).

### **1.8.2.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

A PCR é essencialmente a replicação de DNA *in vitro*, produzindo grandes quantidades de sequências de genes específicos ou outros segmentos de DNA que podem ser usados para uma grande variedade de aplicações. Esta técnica, permite a amplificação de segmentos que podem ir até alguns milhares de pares de bases (Madigan *et al.*, 2015).

A PCR caracteriza-se por três etapas essenciais (Talaro e Chess, 2015):

1. Desnaturação: O primeiro passo envolve o aquecimento de DNA alvo a 94°C – 95°C para desnaturar o DNA. Cada cadeia irá posteriormente tornar-se num DNA molde.

2. Hibridação: A reação é arrefecida (entre 50°C e 65°C, dependendo da sequência dos “primers”) e os “primers” ligam-se a regiões específicas do DNA, delimitando as sequências a amplificar.

3. Extensão: A terceira fase ocorre a 72°C. Nesta, a DNA polimerase é ativada e começa a sintetizar DNA a partir dos “primers”, utilizando os nucleótidos como substrato da reação de polimerização. A enzima desloca-se ao longo das cadeias que servem de molde para a síntese e dá origem a duas cadeias duplas de DNA.

É através da repetição cíclica destas etapas que há amplificação do DNA (Madigan *et al.*, 2015). Quando as cadeias formadas no primeiro ciclo são desnaturadas, tornam-se moldes às quais, posteriormente, se irão ligar os “primers” e sofrer extensão no segundo ciclo. Cada ciclo subsequente converte os novos DNAs em moldes, aumentando o número de cópias (Talaro e Chess, 2015).

Devido às elevadas temperaturas usadas para desnaturar as cópias de cadeia dupla de DNA *in vitro*, é utilizada uma DNA polimerase termostável isolada a partir da bactéria termófila, *Thermus aquaticus*. A enzima é estável até 95°C, não sendo afetada pela temperatura utilizada para desnaturar as cadeias de DNA (Madigan *et al.*, 2015).

Neste trabalho, a PCR foi utilizada para fazer a identificação de *T. marneffei* através do seu DNA.

### **1.8.3 Técnicas de diagnóstico alternativas**

Para além da Reação em cadeia da Polimerase (PCR), poderiam ter sido utilizados outras técnicas que também permitiriam a confirmação da presença de *T. marneffei*. Nestas técnicas incluem-se testes para a deteção de antigénios de *T. marneffei*, como por exemplo ensaio de imunodifusão, teste de aglutinação em látex ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Vanittanakom *et al.*, 2002). Para além destes, a identificação deste fungo pode também ser efetuada a partir da deteção de anticorpos de imunoglobulina G no soro, usando o teste de imunofluorescência indireta, o ensaio de western immunoblot, ensaio de imunodifusão ou ELISA. No entanto, atualmente, nenhum destes ensaios, por si só, proporciona sensibilidade e especificidade suficientes para confirmar o diagnóstico clínico. Como tal, para este trabalho, o método eleito para fazer a identificação fúngica foi a PCR (Vanittanakom *et al.*, 2002; Volberding, 2008).

## 2. Objetivos

Os fungos filamentosos presentes no pelo de animais podem apresentar patogenicidade para os humanos, colocando em risco a Saúde Pública principalmente em indivíduos imunodeprimidos. Estas doenças podem então ter vários graus de severidade, isto é, podem causar desde alergias respiratórias a micoses cutâneas e subcutâneas. Um dos exemplos mais frequente de micose são as dermatofitoses. Como tal, é de grande importância fazer rastreios aos animais tanto domésticos como selvagens e em humanos.

Neste trabalho efetuou-se o isolamento fúngico das amostras de pelo de animais selvagens, domésticos e da mucosa nasal de humanos.

Em termos de objetivos gerais, com este trabalho pretendeu-se:

- Identificar a importância dos isolados em rastreio animal para a saúde pública;
- Fazer a comparação da microbiota nasal entre indivíduos com ou sem animais de estimação;
- Fazer a comparação da microbiota nasal entre indivíduos com ou sem alergias respiratórias.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar fenotipicamente os isolados fúngicos em animais selvagens e domésticos;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados fúngicos em amostras da cavidade nasal;
- Analisar a prevalência de dermatófitos em animais domésticos e selvagens.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Colheita das amostras

Para este estudo foram colhidas amostras da cavidade nasal de humanos, com o intuito de fazer um rastreio comparativo não só entre pessoas com alergias e pessoas saudáveis, mas também entre indivíduos com e sem animais de estimação. Para que fossem respeitadas todas as normas, foi submetido um pedido à Comissão de Ética cujo parecer favorável se encontra no Anexo 1. Às pessoas que aceitaram fazer parte deste estudo foi-lhes pedido para assinarem uma declaração de consentimento informado, onde dispunham de toda a informação que necessitavam sobre este estudo, garantindo sempre o anonimato e a confidencialidade das respostas (Anexo 2). Foi-lhes também pedido para responderem a um curto inquérito para que posteriormente fosse possível realizar o tratamento estatístico dos dados (Anexo 3).

Neste trabalho foram analisadas amostras colhidas entre Fevereiro e Julho de 2016, pertencentes a 73 humanos (11 com idade inferior ou igual a 20 anos, 25 com idades compreendidas entre 21 e 40 anos e 37 idade igual ou superior a 41 anos; 30 do sexo masculino e 43 do sexo feminino). A colheita foi efetuada em ambiente asséptico, ou seja, durante todo o processo foram utilizados equipamentos de proteção individual, como luvas e, a zaragatoa utilizada encontrava-se esterilizada. Para facilitar a recolha, a zaragatoa foi imersa em solução fisiológica antes de ser introduzida na cavidade nasal. Após a colheita, a zaragatoa foi colocada num contentor estéril devidamente identificado com um código. O código criado para estas amostras baseava-se na utilização das letras HN seguido do número da amostra, como por exemplo, HN1.

No que diz respeito aos animais domésticos, um total de 54 amostras, pertencentes a 2 espécies: 28 cães (*Canis lupus familiaris*, 5 jovens e 23 adultos, 10 machos e 18 fêmeas) e 26 gatos (*Felis silvestris catus*, 21 jovens e 5 adultos, 11 fêmeas e 15 machos) foram analisadas. A colheita foi efetuada no período compreendido entre Fevereiro e Julho de 2016. Esta foi também efetuada em ambiente asséptico, ou seja, foram utilizados equipamentos de proteção individual adequados e os instrumentos utilizados foram previamente esterilizados com álcool e posteriormente flamejados. O pelo dos animais foi também previamente desinfetado com recurso a álcool. Após a colheita dos pelos dos animais, foram colocados numa folha de papel não porosa e, esterilizada e identificados com um código. O código baseava-se na utilização da letra D seguida do número da amostra a armazenar, por exemplo, D1. No final de cada colheita

individual todo o material utilizado voltou a ser esterilizado. Foi também pedido aos proprietários dos animais para responderem a um curto inquérito relativo aos mesmos para que posteriormente fosse possível o tratamento estatístico dos dados (Anexo 4).

Foram também analisadas amostras de pelos de animais selvagens que foram colhidas em animais encontrados mortos por atropelamento em estradas ou em animais caçados nos concelhos de Idanha-a-Nova e Penamacor, pertencentes ao distrito de Castelo Branco durante a época venatória entre 2009 e 2014. Os dados pertencentes a cada animal, tais como, a localização, sexo, condição corporal e outros dados considerados relevantes foram registados. A idade foi estimada pelos padrões de erupção dentária e desgaste dentário. Um total de 101 animais selvagens (27 jovens e 74 adultos; 60 machos e 41 fêmeas) foram examinados. Estes 101 animais, pertenciam a 10 espécies diferentes, sendo, 51 raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*), 19 sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), 7 javalis (*Sus scrofa*), 6 lontras (*Lutra lutra*), 5 fuinhas (*Martes foina*), 4 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), 3 ginetos (*Genetta genetta*), 3 texugos (*Meles meles*), 2 ouriços (*Erinaceus europaeus*) e 1 lebre (*Lepus europaeus*).

Todas as colheitas de amostras foram efetuadas por um Médico Veterinário, sendo o pelo dos animais previamente desinfetado com recurso a álcool. As colheitas foram efetuadas com recurso a uma pinça, sendo os pelos dos animais posteriormente colocados num envelope de papel esterilizado. Para cada amostra colhida foi criado um código de forma a que não houvesse erros de identificação de amostras no laboratório e, para que fosse possível a identificação do animal em causa. O código baseava-se na utilização de letras para a identificação da espécie, isto é, DR no caso das raposas e DJ no caso de javalis, por exemplo. Após as letras, seguia-se um número correspondente à amostra a armazenar, por exemplo, DR 651.

## **3.2 Meios de Cultura**

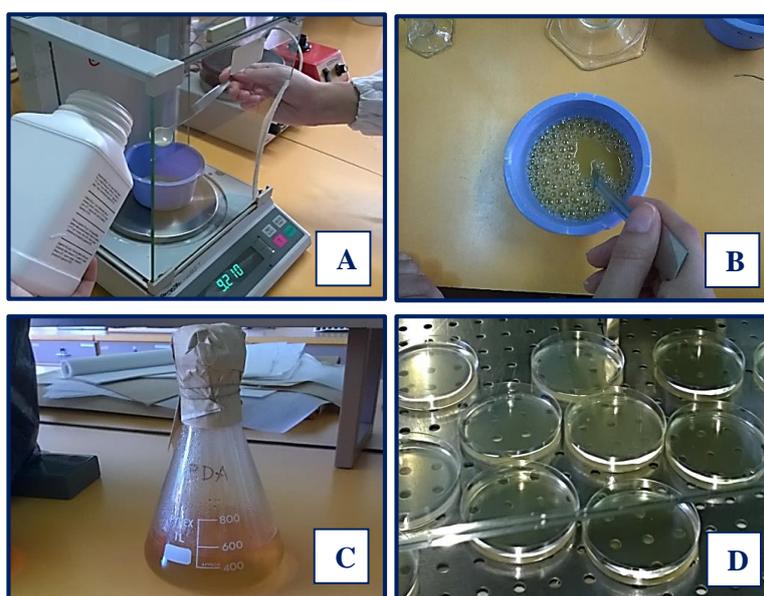
### **3.2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)**

O meio de cultura PDA é um meio bastante utilizado não só porque permite o crescimento de todos os fungos bem como promove a esporulação dos mesmos.

Assim, foram pesadas 42 g de PDA (Liofilchem®) (Figura 10 - A) e adicionados 1000 mL de água destilada num Erlenmeyer, conforme descrito nas informações do fabricante

(Figura 10 - B). De seguida colocou-se uma barra magnética e a respetiva rolha no Erlenmeyer e levou-se a homogeneizar numa placa de agitação. De forma a facilitar esta homogeneização o Erlenmeyer foi colocado em banho-maria até ficar translúcido (Figura 10 - C). Quando esta característica foi observada, o meio preparado foi esterilizado no autoclave (15 min a 121°C).

Posteriormente, o meio ainda quente foi colocado numa câmara de fluxo laminar onde iria ser transferido para as respetivas placas de Petri (Figura 10 - D). Após a deposição e arrefecimento do meio, as placas foram identificadas com o nome do meio de cultura utilizado e com a data e colocadas no frigorífico até a sua utilização. O prazo de validade foi de 1 mês após a sua reconstituição.



**Figura 10.** A, B, C e D - Preparação do meio de cultura PDA (Fotografias do autor).

### 3.2.2 Dermathophyte Test Medium (DTM)

O meio DTM apenas permite o crescimento de fungos dermatófitos, sendo mais rico em proteínas do que em açúcares.

De acordo com as informações do fabricante presentes no rótulo do meio de cultura, foram pesadas 36,8 g de DTM (Liofilchem®) e adicionados 1000 mL de água destilada. Posteriormente foram seguidos os passos descritos anteriormente na preparação do meio PDA, até à etapa em que se observa a completa dissolução do meio de cultura após algum tempo em banho-maria. De seguida, o meio ainda quente, foi distribuído por vários frascos, sendo o volume final de 9 mL em cada frasco. Depois de dividido o meio, os frascos foram autoclavados

durante 15 min a 121°C para eliminar qualquer tipo de contaminações e para manter a máxima esterilidade. Os frascos, com o meio ainda quente, foram colocados em suportes de forma a que o meio adquirisse uma posição inclinada ao solidificar (Figura 11). Este passo é importante para evitar a rápida desidratação do meio e para aumentar a área de contacto com o oxigénio. Por fim, os frascos foram guardados a cerca de 20°C e protegidos da luz tal como recomendado nas instruções do fabricante.

Note-se que este meio, que naturalmente apresenta uma coloração amarela, possui a particularidade de mudar de cor na presença de fungos dermatófitos. Esta mudança de cor deve-se ao facto de este tipo de fungos metabolizarem as proteínas constituintes do meio, tornando o pH alcalino. Uma vez que o meio possui um indicador, o vermelho de fenol, a alteração de pH é passível de ser observada quando se dá a alteração da cor do meio de amarelo para vermelho.



**Figura 11.** Frascos com DTM num suporte inclinado (Fotografia do autor).

### 3.3 Isolamento das amostras

As amostras de pelo dos animais selvagens e domésticos foram semeadas em dois meios de cultura que possuíam as condições indicadas para o crescimento de fungos. Os meios utilizados para o isolamento foram Potato Dextrose Agar (PDA) (Liofilchem®) e Dermathophyte Test Medium (DTM) (Liofilchem®).

Neste processo foram colocados pelos sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de uma pinça (Figura 12 - A e B). É importante referir que cada amostra foi repartida pelos dois meios de crescimento referidos anteriormente (PDA e DTM). No caso dos frascos de DTM, a rolha não estava completamente apertada para não privar os eventuais dermatófitos

de oxigénio, no caso de os mesmos estarem presentes na amostra. As amostras de animais selvagens foram semeadas em duplicado, tanto em PDA como em DTM.

As amostras nasais, por sua vez, foram apenas semeadas num dos meios, PDA, uma vez que o nariz não possui queratina e, portanto, não iria haver crescimento de fungos dermatófitos. Neste processo as amostras foram semeadas com recurso à zaragatoa utilizada para fazer a colheita sendo utilizado o método de inoculação por estrias. Neste método foi utilizada uma zaragatoa ou outro instrumento semelhante contendo o inóculo e posteriormente o meio de cultura foi “riscado” superficialmente (Figura 10 - C). Todo o processo foi executado num ambiente asséptico, isto é, na presença de um bico de Bunsen, e todas as regras de biossegurança foram cumpridas, isto é, a utilização de luvas e bata. Todo o material foi previamente desinfetado com o recurso a álcool a 70%, seguido de flamejação do mesmo. Depois de semeadas, as placas com as amostras foram devidamente identificadas com o mesmo código anteriormente utilizado e isoladas com película. As placas de Petri com PDA e os frascos com DTM foram colocados na estufa a 25°C, em ambiente húmido e escuro.



**Figura 12.** Processo de inoculação das amostras: **A** – Inoculação de uma amostra de um animal selvagem em PDA; **B** - Inoculação de uma amostra de um animal selvagem em DTM; **C** – Inoculação de uma amostra nasal em PDA (Fotografias do autor).

### 3.4 Isolamento dos fungos

Para caracterizar individualmente um fungo é necessário obtê-lo em cultura pura. Para isso efetuou-se a repicagem dos fungos, ou seja, foi feita extração de uma pequena porção de meio onde estava situado o fungo com uma ansa previamente esterilizada, seguindo-se a sua colocação numa nova placa de Petri com meio PDA. É de salientar que a parte superficial do fungo deveria ficar virado para o novo meio. Todo o processo de isolamento, isto é, a separação de um fungo a partir de populações mistas, foi realizado numa câmara de fluxo laminar. De seguida as placas foram devidamente isoladas com película e colocadas na estufa a 25°C para

que fosse possível o crescimento do fungo e fossem obtidas colónias perfeitamente individualizadas.

Este procedimento foi efetuado tanto para as colónias das amostras dos animais selvagens e domésticos bem como das amostras dos humanos.

### **3.5 Identificação dos fungos**

A identificação fúngica foi realizada a partir das observações macroscópicas e microscópicas das características e componentes estruturais dos fungos filamentosos isolados, recorrendo-se aos livros *Clinical Veterinary Microbiology* (1994), *Clinical Mycology* (2009) e *Infectious diseases of the dog and cat* (2012), ao artigo de Prata, (2007) e ao endereço eletrónico pertencente à Universidade de Adelaide, na Austrália: <http://www.mycology.adelaide.edu.au> como meios de comparação para as colónias e estruturas microscópicas obtidas.

#### **3.5.1 Identificação macroscópica**

Para se proceder à correta identificação dos fungos presentes nas amostras, é necessário recorrer à análise macroscópica e microscópica das colónias, comparando-as com as fontes utilizadas, neste caso os livros, o artigo e o endereço eletrónico mencionados anteriormente.

A análise macroscópica pode ser muito variada em termos de aspeto. Esta corresponde à análise do verso e reverso da placa utilizando como parâmetros de comparação a cor, a textura e a velocidade de crescimento das colónias.

#### **3.5.2 Identificação microscópica**

De forma a complementar o que foi observado macroscopicamente e a que seja possível fazer a completa identificação da colónia fúngica em estudo, é necessário fazer também a análise microscópica.

Esta análise baseia-se na preparação de uma lâmina com uma pequena parte da estrutura do fungo, seguida da observação microscópica do mesmo.

### 3.5.2.1 Método do Lactofenol com Azul de Algodão

Para que a análise microscópica seja bem-sucedida é necessário utilizar um corante que permita a distinção entre as diferentes estruturas do fungo e que possibilite a identificação das mesmas. Assim, para este efeito, foi utilizado o corante Lactofenol com Azul de Algodão.

O método utilizado é bastante simples e consiste no seguinte: retirar uma lâmina do frasco com álcool a 70%, deixar secar, identificar com o código definido para a amostra em questão e de seguida colocar uma a duas gotas deste corante na lâmina. Depois de esta preparação estar feita, corta-se uma tira de fita-cola e com o auxílio de uma pinça decalca-se o fungo para que este adira à fita-cola. Assim que se verifique a aderência na fita-cola, esta é colocada na lâmina, em cima da gota de corante (Figura 13). Note-se que se deve decalcar a parte mais externa, ou seja, mais perto da extremidade da placa de Petri uma vez que este é o local que apresenta menos esporulação do fungo. Deve também ter-se em atenção a forma como é colocada a fita-cola, isto é, certificar-se que a parte que tem a cola é a que fica voltada para a lâmina.

Este processo foi utilizado para a identificação das estruturas fúngicas das amostras presentes no meio PDA. No que diz respeito às amostras dos animais, este método foi utilizado para a preparação das lâminas dos fungos filamentosos presentes no meio PDA, e também na preparação das lâminas de possíveis fungos dermatófitos que apresentaram crescimento no meio DTM. Todo o processo foi realizado na presença do bico de Bunsen e todo o material foi devidamente esterilizado com álcool a 70% seguido de flamação, sendo também obrigatório o uso de luvas. Posteriormente procedeu-se à identificação microscópica na objetiva de 40x, analisando as características estruturais e comparando com as fontes anteriormente indicadas.



**Figura 13.** Lâminas preparadas com o método do Lactofenol Azul de Algodão (Fotografia do autor).

### 3.5.3 Identificação de *T. marneffei*

No caso de *T. marneffei*, também se procede à identificação macroscópica e microscópica, tal como nos outros géneros fúngicos. No entanto, sendo este um género dimórfico, pode-se utilizar esse aspeto como uma vantagem, permitindo-nos fazer a confirmação da identificação. Assim, a partir de uma colónia de *T. marneffei* pura, transferiram-se alguns esporos com uma ansa, para um frasco com meio Brain Heart Infusion (BHI). Este meio é utilizado por muitos autores, como por exemplo, Vanittanakom *et al.*, (2006), Ahmad *et al.*, (2010) e Ellis (2016) para realizar esta conversão de fases por ser um meio enriquecido onde crescem quase todos os fungos (McClatchey, 2002). Em alternativa pode ser utilizado o meio Saboraud Dextrose Agar (Yang *et al.*, 2013) ou o meio Agar Sangue (Duong, 1996).

Após ser semeado no meio de cultura, o fungo foi colocado a 37°C em ambiente escuro e húmido durante cerca de uma semana para que desenvolvesse a sua forma de levedura. Quanto às características macroscópicas, observou-se uma levedura com uma coloração pálida, entre o branco e o dourado. Para se realizar a observação microscópica, foi efetuada uma coloração simples com azul de metileno. Ao microscópio observam-se células esféricas a elipsoidais, com 2 a 6 µm de diâmetro que se dividem por fissão, sendo também possível verificar a presença numerosas hifas curtas (WHO, 2009). Em alternativa, poderia ter sido utilizada uma coloração diferencial, a coloração de Gram. O princípio da coloração de Gram está relacionado com a ligação do violeta de metilo e da safranina às paredes celulares, normalmente às bacterianas. No entanto, esta técnica é também extremamente útil para detetar a presença de elementos fúngicos. As leveduras são unicelulares e têm uma parede celular muito mais espessa do que a das bactérias Gram positivas. Como resultado, o complexo violeta de metilo-lugol mantém-se dentro da célula, ficando estas coradas de roxo, tal como as Gram positivas (Mohan, 2009).

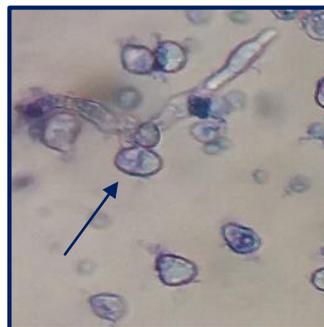
#### 3.5.3.1 Coloração Simples com Azul de Metileno

A utilização dos corantes permite que as células observadas se tornem mais facilmente visíveis e também possibilita evidenciar diferenças entre células de diferentes espécies com a utilização de soluções corantes apropriadas. Neste trabalho o corante utilizado foi o azul de metileno, encontrando-se de seguida descrito o procedimento desta técnica:

### Coloração Simples com Azul de Metileno

- 1 - Numa lâmina limpa colocar uma a duas gotas de solução fisiológica.
- 2 - Com uma ansa retirar uma colônia de levedura e misturar bem na gota de solução fisiológica.
- 3 - Deixar secar e passar 3 vezes na chama do bico de Bunsen para fixar.
- 4 - Cobrir a lâmina com azul de metileno durante 1 minuto.
- 5 - Passar a lâmina em água corrente.
- 6 - Deixar secar e observar ao microscópio óptico com óleo de imersão.

Na Figura 14 pode observar-se uma imagem microscópica obtida da levedura de *T. marneffe*.



**Figura 14.** Imagem microscópica de *T. marneffe* na forma de levedura (x1000) (Fotografia do autor).

### 3.5.4 Conservação em água destilada esterilizada

Para que os fungos pudessem ser submetidos a PCR, teve que ser feita a sua conservação em água destilada esterilizada. Para tal, colocou-se água destilada esterilizada na placa que continha o fungo em questão e agitou-se ligeiramente de forma a que os esporos ficassem envolvidos na água. De seguida, com uma pipeta de Pasteur, a água contendo os esporos foi colocada num tubo estéril devidamente identificado e posteriormente fechado (Figura 15). Todo o procedimento foi realizado na presença do bico de Bunsen e equipamento de proteção individual.



**Figura 15.** Conservação do fungo em água destilada (Fotografia do autor).

### 3.5.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com recurso ao kit *Plant/Fungi DNA Isolation* (Norgen Biotek<sup>®</sup>), seguindo o protocolo fornecido no mesmo, com algumas modificações, como se descreve em seguida:

#### Preparação do lisado

- 1 - Colocaram-se 200 µL de células em suspensão, num microtubo (centrifugou-se um volume que permitiu a formação de um pellet de 50-100 mg).
- 2 - Adicionaram-se 500 µL de *Lysis Buffer L* e 1 µL de RNase.
- 3 - Num microtubo colocaram-se 0,25 mL de esferas de sílica e juntou-se à mistura anterior.
- 4 - Homogeneizou-se, utilizando o *Tissuelyser* (Qiagen<sup>®</sup>).
- 5 - Incubou-se 30 minutos, em banho-maria, a 65°C (inverteram-se os tubos aos 10, 20 e 30 minutos).
- 6 - Centrifugou-se a 13.000 rpm durante 10 minutos.
- 7 - Retirou-se o sobrenadante para um novo microtubo.
- 8 - Adicionaram-se 100 µL de *Binding Buffer I* e misturou-se bem.
- 9 - Incubou-se 5 minutos no gelo.
- 10 - Transferiu-se o conteúdo anterior para a coluna de filtração (anel branco) acoplada a um tubo coletor, centrifugou-se a 13.000 rpm durante 2 minutos.
- 11 - Transferiu-se o lisado para um novo microtubo e verificou-se o volume, adicionando-se igual volume de etanol a 70 %. Misturou-se por inversão.

#### Ligação

- 12 - Pipetaram-se 650 µL da mistura anterior para a coluna com anel cinzento acoplada a um tubo coletor.
- 13 - Centrifugou-se a 10.000 rpm durante 1 minuto.
- 14 - Descartou-se o filtrado e reutilizou-se o tubo coletor para repetir os dois últimos passos, caso ainda houvesse solução (lisado + etanol).
- 15 - Descartou-se o filtrado.

#### Lavagem

- 16 - Adicionaram-se 500 µL de *Buffer WN* na coluna e centrifugou-se 1 minuto a 10.000 rpm.

- 17** - Descartou-se o filtrado e reutilizou-se o tubo coletor.
- 18** - Adicionaram-se 500 µL de *Wash Solution A* na coluna e centrifugou-se 1 minuto a 10.000 rpm.
- 19** - Descartou-se o filtrado e reutilizou-se o tubo coletor.
- 20** - Repetiram-se o passo 18 e 19.
- 21** - Descartou-se o filtrado.
- 22** - Centrifugou-se o tubo e coluna a 13.000 rpm durante 2 minutos.
- 23** - Descartou-se o filtrado e o tubo coletor.

### **Eluição**

- 24** - Colocou-se a coluna num tubo de 1,5 mL, adicionaram-se 100 µL de *Elution Buffer B* e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10.000 rpm durante 1 minuto.
- 25** - Repetiu-se o passo anterior, mas com 50 µL de *Elution Buffer B*, para um novo tubo. Centrifugou-se a 10.000 rpm durante 1 minuto.

### **3.5.6 Qualidade do DNA**

Para se verificar a qualidade do DNA extraído, foi feita uma análise em gel de agarose (1%). Para tal, foram pesados 0,60 g de agarose em pó e adicionados 60 mL de TBE 1x (Tris-Borato-EDTA), sendo a mistura dissolvida por aquecimento até à ebulição. De seguida foi adicionado 1,5 µL de *GreenSafe* (Nzytech®), um composto altamente sensível para visualização de DNA quando exposto a luz UV, especificamente formulado para ser uma alternativa segura à utilização de brometo de etídio.

Posteriormente, o gel foi colocado no suporte até solidificar. Após a solidificação, foi colocado um marcador de peso molecular - *Gene Ruler™ DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific®) nos poços das extremidades e, às amostras, foi adicionada solução de deposição (Thermo Scientific®) composta por azul de bromofenol, tampão (TBE) e glicerol, antes da deposição. O gel foi depois sujeito a electroforese a 80V durante cerca de 1 hora. Para a visualização do gel recorreu-se ao equipamento *Gel Doc™ XR* (Molecular Imager®) com o *software Image Lab™* (Bio Rad®).

### 3.5.7 Nested-PCR

O DNA foi testado por Nested-PCR, seguindo o procedimento descrito por Vanittanakom *et al.* (2002). Este tipo de PCR baseia-se em duas reações com “primers” que amplificam sequências específicas do gene 18S rRNA. A primeira amplificação é realizada com “primers” (RRF1 e RRH1) específicos para fungos, resultando no aparecimento de uma banda de aproximadamente 600pb. Já na segunda reação, foram utilizados “primers” (Pm1 e Pm2), que amplificam um fragmento de 400pb no caso de estarmos perante uma amostra de *T. marneffei*, sendo estes “primers” considerados específicos para este fungo. A sequência dos “primers” utilizados pode observar-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** “Primers” utilizados e respectivas sequências.

Nome	Sequência (5' - 3')
RRF1	ATCTAAATCCCTTAACGAGGAACA
RRH1	CCGTCAATTTCTTTAAGTTTCAGCCTT
Pm1	ATGGGCCTTTCTTTCTGGG
Pm2	GCGGGTCATCATAGAAACC

Para a 1ª reação da Nested-PCR, foi feita a Mix com as quantidades indicadas na Tabela 2. De seguida, em cada tubo, foram colocados 3 µL de DNA extraído anteriormente, juntamente com 17 µL da Mix. Este processo foi repetido para todas as amostras.

**Tabela 2.** Quantidades dos componentes utilizados para a Mix da primeira reação.

Reagente	Volume
Mastermix (Bioron®)	10 µL
“Primer” RRF1	1 µL
“Primer” RRH1	1 µL
Água	5 µL
DNA	3 µL

De seguida as amostras foram colocadas no termociclador durante aproximadamente duas horas e trinta minutos, onde foram sujeitas a diferentes ciclos de tempo e temperatura, como se pode ver na Tabela 3.

**Tabela 3.** Condições da primeira reação da Nested-PCR.

Tempo	Temperatura	Número de ciclos
5 minutos	95°C	1
30 segundos	95°C	35
30 segundos	55°C	
2 minutos	72°C	
10 minutos	72°C	1

Após a reação de PCR, dos 20  $\mu\text{L}$  de cada tubo, 5  $\mu\text{L}$  foram armazenados no congelador, 14  $\mu\text{L}$  foram utilizados para a eletroforese e 1  $\mu\text{L}$  foi guardado para a 2ª reação da Nested-PCR. Para a eletroforese, foi realizado um gel de agarose (1%) com 1,5  $\mu\text{L}$  de *GreenSafe* (Nzytech®). Aos 14  $\mu\text{L}$  de DNA foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de solução de deposição (Thermo Scientific®) sendo posteriormente colocados nos poços do gel (Figura 16 - A).

No primeiro e no último poço do gel foi colocado um marcador de peso molecular - *Gene Ruler™ DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific®). Este foi sujeito a 80V durante cerca de 1 hora (Figura 16 - B). Para a visualização do gel recorreu-se ao equipamento *Gel Doc™ XR* (Molecular Imager®) com o *software Image Lab™* (Bio Rad®).



**Figura 16.** Técnica de eletroforese: **A** – Colocação do DNA (juntamente com a solução de deposição) no gel; **B** - Tina com o gel de agarose, submetida a 80V (Fotografias do autor).

Quanto à 2ª reação da Nested-PCR, o microlitro reservado foi diluído numa proporção de 1:1000 (1  $\mu\text{L}$  de DNA + 999  $\mu\text{L}$  água). De seguida, foi feita a Mix com as quantidades indicadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Reagentes utilizados para a Mix da segunda reação.

Reagente	Volume
Mastermix (Bioron®)	10 µL
“Primer” Pm1	1 µL
“Primer” Pm2	1 µL
Água	7 µL
DNA (1:1000)	1 µL

Posteriormente as amostras foram colocadas no termociclador, onde foram sujeitas a diferentes ciclos de tempo e temperatura (Tabela 5).

**Tabela 5.** Condições da segunda reação da Nested-PCR.

Tempo	Temperatura	Número de ciclos
5 minutos	95°C	1
30 segundos	95°C	35
30 segundos	65°C	
2 minutos	72°C	
10 minutos	72°C	1

Após a reação de PCR, os 20 µL foram utilizados para a eletroforese. A este volume foram adicionados 2 µL de solução de deposição sendo posteriormente o gel sujeito a 80V durante cerca de 1 hora. Para a visualização do gel recorreu-se ao equipamento *Gel Doc*<sup>TM</sup> XR (Molecular Imager®) com o *software Image Lab*<sup>TM</sup> (Bio Rad®).

### 3.6 Análise de dados

A análise estatística dos dados, tanto os obtidos como resultados laboratoriais como os obtidos através da análise dos inquéritos epidemiológicos, foi efetuada com recurso ao programa SPSS® 22.0. O estudo da associação entre variáveis foi efetuada pela análise do qui-quadrado e pelo teste exato de Fischer com um grau de probabilidade (p)<0,05.

## 4. Resultados

### 4.1 Rastreio da colonização nasal por fungos

Foi efetuado um rastreio por zaragatoa nasal a 73 pessoas das quais 30 (41,1%) eram do sexo masculino e 43 (58,9%) eram do sexo feminino. Relativamente à idade, 15,0% tinham idade igual ou inferior a 20 anos e 32,9% tinham idade compreendida entre os 21 e os 40 anos e 52,1% tinham idade igual ou superior a 41 anos. Cerca de 30,1% afirmavam ter alergias e 76,7% conviviam com animais como cão e gato. Na grande maioria das amostras (86,3%) foram isolados fungos na mucosa nasal. No total isolaram-se 13 géneros de fungos filamentosos e uma levedura. A prevalência dos diferentes géneros fúngicos isolados das amostras nasais encontra-se sumariada na Tabela 6. Os géneros mais prevalentes foram *Penicillium* (49,3%), *Mucor* (31,5%), *Cladosporium* (26,0%) e *Aspergillus* (17,8%).

**Tabela 6.** Prevalência dos géneros fúngicos isolados a partir da mucosa nasal de 73 humanos.

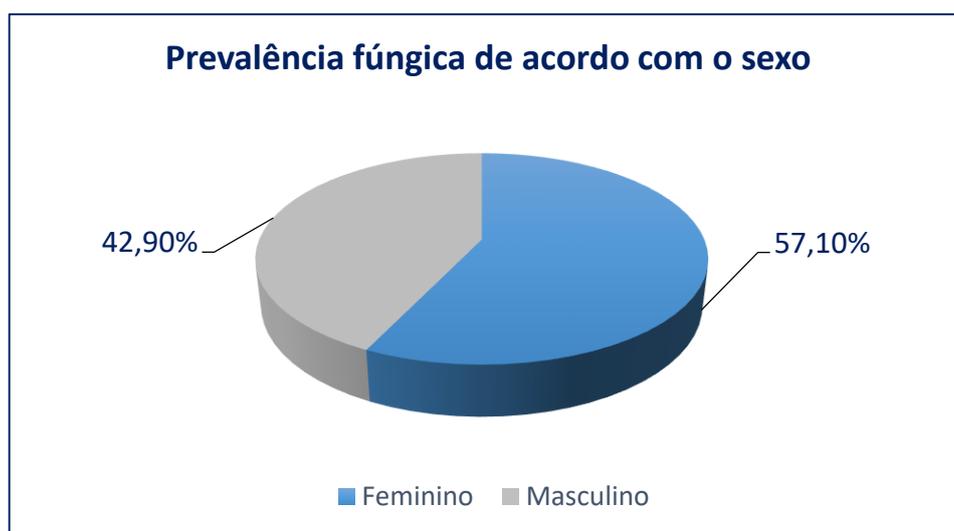
Micobiota	Número (n) de amostras nasais com crescimento fúngico	Percentagem de amostras nasais com crescimento fúngico
<i>Absidia</i>	1	1,4%
<i>Alternaria</i>	2	2,7%
<i>Aspergillus</i>	13	17,8%
<i>Aureobasidium</i>	1	1,4%
<i>Botrytis</i>	2	2,7%
<i>Cladosporium</i>	19	26,0%
<i>Mucor</i>	23	31,5%
<i>Penicillium</i>	36	49,3%
<i>Rhizopus</i>	1	1,4%
<i>Rhodotorula</i>	8	11,0%
<i>Talaromyces marneffe</i>	3	4,1%
<i>Trichoderma</i>	1	1,4%
<i>Trichotrecium</i>	1	1,4%
<i>Ulocladium</i>	1	1,4%

#### 4.1.1 Efeito do sexo na colonização nasal

Neste estudo, 43 voluntários eram do sexo feminino, enquanto 30 eram do sexo masculino. A percentagem de crescimento fúngico foi de 83,7% (n=36) e 90,0% (n=27), respetivamente. A prevalência de crescimento fúngico foi superior em indivíduos do sexo feminino (57,1%) comparativamente com os indivíduos do sexo masculino (42,9%) (Figura 17), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas (p=0,510). Os géneros e espécies de *Absidia*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Talaromyces marneffe*, *Ulocladium* apenas foram isolados em indivíduos do sexo feminino.

Os géneros *Trichoderma* e *Trichothecium* apenas foram isolados em indivíduos do sexo masculino.

Os géneros *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhodotorula* foram isolados em ambos os sexos e as diferenças não foram significativas.



**Figura 17.** Prevalência de crescimento fúngico de acordo com o sexo.

#### 4.1.2 Efeito da idade na colonização nasal

Neste estudo, 11 indivíduos tinham idade igual ou inferior a 20 anos, 25 tinham idades compreendidas entre 21 e 40 anos e 37 idade igual ou superior a 41 anos. A percentagem de crescimento fúngico foi de 90,9% (n=10), 84,0% (n=21) e 86,5% (n=32), respetivamente. A prevalência de crescimento fúngico foi superior em indivíduos com idade igual ou superior a 41 anos (52,4%) comparativamente com os indivíduos com idades compreendidas entre 21 e

40 anos (31,7%) e com idade igual ou inferior a 20 anos (15,9%) (Figura 18), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p=0,819$ ). Os géneros e espécies de *Absidia*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Talaromyces marneffeii*, *Trichoderma*, *Trichothecium* e *Ulocladium* apenas foram isolados em indivíduos com idades iguais ou superiores a 21 anos.



**Figura 18.** Prevalência de crescimento fúngico de acordo com a idade.

#### 4.1.3 Relação entre alergias e outras doenças respiratórias e colonização nasal

Neste estudo, 22 dos indivíduos inquiridos admitiram ter alergias, enquanto 51 mostraram não ter este problema de saúde. A percentagem de crescimento fúngico foi de 81,8% ( $n=18$ ) e 88,2% ( $n=45$ ), respetivamente. A prevalência de crescimento fúngico foi superior em indivíduos que responderam no inquérito não terem alergias (71,4%) comparativamente com os indivíduos que responderam que tinham alergias (28,6%) mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p=0,474$ ). A frequência do isolamento fúngico nestes dois grupos de indivíduos encontra-se descrita na Tabela 7.

Os géneros e espécies de *Absidia*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Talaromyces marneffeii*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Ulocladium* apenas foram isolados em indivíduos que não tinham alergias.

A prevalência de crescimento fúngico foi superior em indivíduos que responderam no inquérito não terem doenças respiratórias (de qualquer natureza) (85,7%) comparativamente

com os indivíduos que responderam que tinham esse tipo de doenças (14,3%) mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p=0,352$ ).

Os gêneros e espécies de *Absidia*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Talaromyces marneffe*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Ulocladium* apenas foram isolados em indivíduos que responderam que não tinham doenças respiratórias.

**Tabela 7.** Frequência do isolamento fúngico em indivíduos saudáveis e alérgicos.

<b>Micobiota</b>	<b>Saudáveis: n (%)</b> <b>n=51</b>	<b>Alérgicos: n (%)</b> <b>n=22</b>
<i>Absidia</i>	1 (2,0%)	0 (0,0%)
<i>Alternaria</i>	1 (2,0%)	1 (4,5%)
<i>Aspergillus</i>	10 (19,6%)	3 (13,6%)
<i>Aureobasidium</i>	1 (2,0%)	0 (0,0%)
<i>Botrytis</i>	2 (3,9%)	0 (0,0%)
<i>Cladosporium</i>	14 (27,5%)	5 (22,7%)
<i>Mucor</i>	14 (27,5%)	9 (40,1%)
<i>Penicillium</i>	30 (58,8%)	6 (27,3%)
<i>Rhizopus</i>	1 (2,0%)	0 (0,0%)
<i>Rhodotorula</i>	7 (13,7%)	1 (4,5%)
<i>Talaromyces marneffe</i>	3 (5,9%)	0 (0,0%)
<i>Trichoderma</i>	1 (2,0%)	0 (0,0%)
<i>Trichothecium</i>	1 (2,0%)	0 (0,0%)
<i>Ulocladium</i>	1 (2,0%)	0 (0,0%)

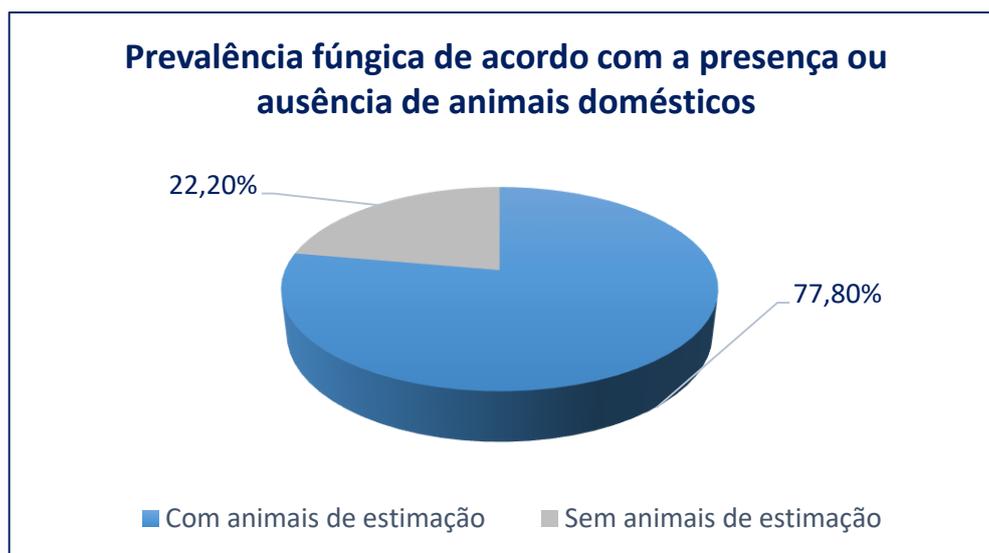
#### **4.1.4 Relação entre o convívio com animais e colonização nasal**

Neste estudo, 56 dos indivíduos inquiridos admitiram ter contato diário com animais de companhia, enquanto 17 mostraram não ter qualquer contato com animais. A percentagem de crescimento fúngico foi de 87,5% (n=45) e 82,4% (n=14), respetivamente. A prevalência de crescimento fúngico foi superior em indivíduos que conviviam diariamente com animais de

companhia (77,8%) comparativamente com os indivíduos que não conviviam (22,2%) (Figura 19) mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p=0,598$ ).

Os gêneros e espécies de *Absidia*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Talaromyces marneffeii*, *Ulocladium*, apenas foram isolados em indivíduos que conviviam com animais.

O isolamento de *Mucor* foi estatisticamente superior em indivíduos que conviviam diariamente com animais de companhia (95,7%;  $p=0,022$ ).



**Figura 19.** Prevalência de crescimento fúngico de acordo com a presença ou ausência de animais domésticos.

#### 4.2 Rastreo da micobiota do pelo em cães e gatos

Analisaram-se 54 amostras das quais 51,9% ( $n=28$ ) pertenciam a cães e 48,1% ( $n=26$ ) a gatos.

Relativamente aos cães, 52,3% ( $n=23$ ) eram adultos e 17,9% ( $n=5$ ) eram jovens. Quanto ao sexo, 64,3% ( $n=18$ ) eram fêmeas e 35,7% ( $n=10$ ) eram machos.

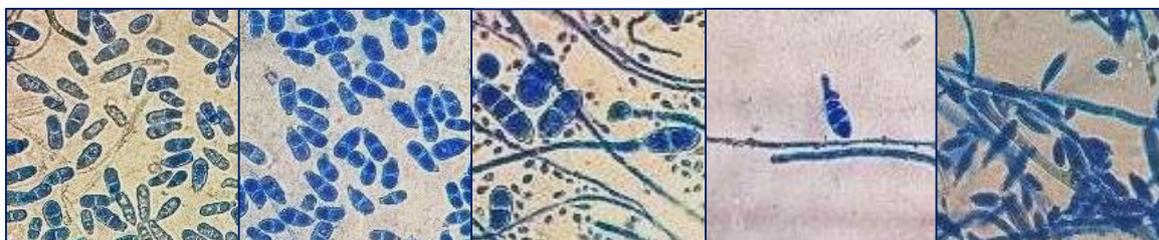
Quanto aos gatos, 80,8% ( $n=21$ ) eram adultos e 19,2% ( $n=5$ ) eram jovens. Quanto ao sexo, 42,3% ( $n=11$ ) eram fêmeas e 57,7% ( $n=15$ ) eram machos.

Dos animais amostrados 5 (9,3%) animais apresentavam lesões do foro dermatológico, dos quais 3 eram cães e 2 eram gatos.

Observou-se crescimento fúngico em 96,3% ( $n=52$ ) dos animais. O crescimento foi muito semelhante em cães (51,9%) e em gatos (48,1%). No total, foram isolados 9 gêneros de fungos filamentosos oportunistas, 1 levedura e dermatófitos (todos eles do género *Microsporum*: dois *Microsporum nanum*, um *Microsporum gypseum* e dois *Microsporum* spp.)

(Figura 20). Houve dois isolados que não foram passíveis de identificação. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre cães e gatos em nenhum dos géneros isolados.

A frequência de fungos isolados nos cães e gatos encontra-se na Tabela 8.



**Figura 20.** Imagens microscópicas (x1000) dos dermatófitos isolados nos animais de companhia: *Microsporium nanum*, *Microsporium nanum*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium* spp., *Microsporium* spp..

**Tabela 8.** Frequência do isolamento fúngico em cães e gatos.

<b>Micobiota</b>	<b>Cães: n (%)</b> <b>n=28</b>	<b>Gatos: n (%)</b> <b>n=26</b>	<b>Total: n (%)</b> <b>n=54</b>
<i>Alternaria</i>	3 (10,7%)	2 (7,7%)	5 (9,3%)
<i>Aspergillus</i>	5 (17,9%)	5 (19,2%)	10 (18,5%)
<i>Cladosporium</i>	11 (39,3%)	14 (53,8%)	25 (46,3%)
<i>Mucor</i>	6 (21,4%)	7 (26,9%)	13 (24,1%)
<i>Penicillium</i>	11 (39,3%)	11 (42,3%)	22 (40,7%)
<i>Rhizomucor</i>	2 (7,1%)	0 (0,0%)	2 (3,7%)
<i>Rhizopus</i>	0 (0,0%)	2 (7,7%)	2 (3,7%)
<i>Rhodotorula</i>	5 (17,9%)	2 (7,7%)	7 (13,0%)
<i>Talaromyces marneffe</i>	0 (0,0%)	1 (3,8%)	1 (1,9%)
<i>Verticillium</i>	0 (0,0%)	2 (7,7%)	2 (3,7%)
<b>Dermatófitos</b>	2 (7,1%)	3 (11,5%)	5 (9,3%)
<b>Fungos filamentosos não identificados</b>	1 (3,6%)	1 (3,8%)	2 (3,7%)

Os géneros fúngicos mais prevalentes em cães foram *Cladosporium* (39,3%; n=11), *Penicillium* (39,3%; n=11), *Mucor* (21,5%; n=6), *Aspergillus* (17,9%; n=5) e *Rhodotorula* (17,9%; n=5). Já em gatos, o género fúngico mais prevalente foi *Cladosporium* (53,8%; n=14),

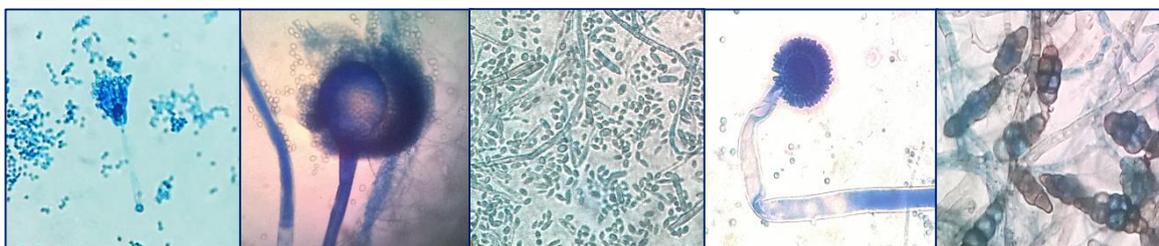
seguido de *Penicillium* (42,3%; n=11), *Mucor* (26,9%; n=7) e *Aspergillus* (19,2%; n=5). Na Figura 21 podem observar-se imagens das colónias dos géneros fúngicos mais frequentes. Neste estudo isolaram-se 5 dermatófitos, tendo sido a prevalência de isolamento de 9,3%. A prevalência em cães foi de 7,1% e em gatos foi de 11,5%.



**Figura 21.** Imagens macroscópicas dos géneros fúngicos mais isolados em animais de companhia: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Aspergillus*.

#### 4.2.1 Isolamento em simultâneo em animais e humanos

Neste trabalho isolaram-se amostras dos proprietários (zaragatoas nasais) e dos respetivos animais de companhia, havendo concordância dos mesmos em alguns géneros fúngicos. Para a análise dos resultados assumiu-se que desde que um dos animais de companhia apresentasse um fungo existente na amostra nasal do proprietário, haveria concordância nesse género fúngico. O valor entre parêntesis significa o número de vezes em que os géneros fúngicos se isolaram em simultâneo: *Penicillium* (18), *Mucor* (12), *Cladosporium* (9), *Aspergillus* (5), *Alternaria* (1). Na Figura 22 podem ver-se imagens microscópicas dos géneros fúngicos isolados simultaneamente.

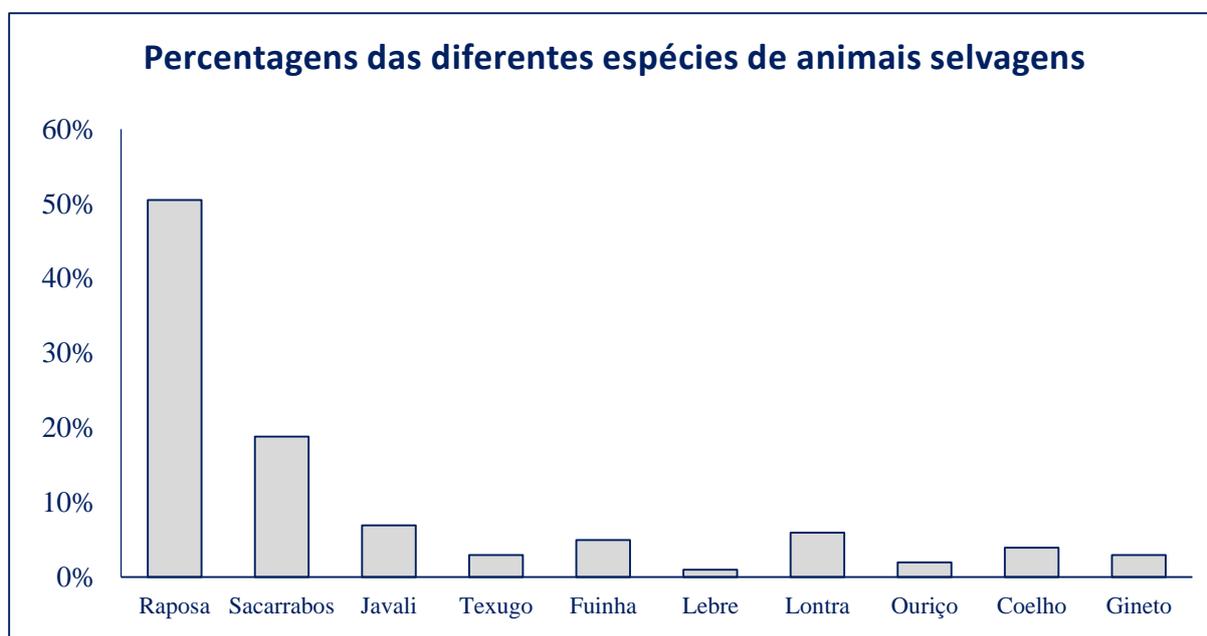


**Figura 22.** Imagens microscópicas (x1000) dos géneros fúngicos isolados simultaneamente em humanos e animais: *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Alternaria* (Fotografias do autor).

### 4.3 Rastreo da microbiota integumentária em animais selvagens

Durante o período do estudo, um total de 101 animais selvagens foram analisados. Os resultados foram obtidos de 202 culturas. Das 101 amostras colhidas, foram obtidos 426 isolados fúngicos na sua forma pura.

Dos 101 animais selvagens sujeitos ao estudo, 50,50% (n=51) eram raposas-vermelhas, 18,81% (n=19) sacarrabos, 6,93% (n=7) javalis, 2,97% (n=3) texugos, 4,95% (n=5) fuinhas, 0,99% (n=1) lebre, 5,94% (n=6) lontras, 1,98% (n=2) ouriços, 3,96% (n=4) coelhos e 2,97% (n=3) ginetos, como se pode ver na Figura 23.



**Figura 23.** Percentagens das diferentes espécies dos animais selvagens sujeitos ao estudo.

Neste estudo, verificou-se a presença de fungos no pelo de 84 animais (83,2%).

A prevalência dos diferentes géneros fúngicos isolados dos animais selvagens pode observar-se na Tabela 9. Foram identificados 20 géneros fúngicos e 8 dermatófitos (cinco *Trichophyton* spp., um *Microsporum canis* e dois *Microsporum* spp.).

Os fungos mais prevalentes foram: *Mucor* (n=38; 37,6%), *Penicillium* (n=21; 20,8%) e *Aspergillus* (n=15; 14,9%).

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a prevalência da presença fúngica e o género (p=0,554), idade (p=0,392), concelho onde foram encontrados (p=0,770) e condição corporal (p=0,582).

**Tabela 9.** Prevalência dos diferentes géneros fúngicos isolados nos 101 animais selvagens.

<b>Micobiota</b>	<b>Número (n) de animais selvagens que apresentaram crescimento fúngico</b>	<b>Percentagem de animais selvagens que apresentaram crescimento fúngico</b>
<i>Absidia</i>	1	1,0%
<i>Alternaria</i>	6	5,9%
<i>Aspergillus</i>	15	14,9%
<i>Aspergillus flavus</i>	1	1,0%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1,0%
<i>Aspergillus niger</i>	13	12,9%
<i>Apophisomyces</i>	1	1,0%
<i>Aureobasidium</i>	3	3,0%
<i>Cladosporium</i>	9	8,9%
<i>Fusarium</i>	2	2,0%
<i>Geotrichum</i>	9	8,9%
<i>Mucor</i>	38	37,6%
<i>Onychocola</i>	1	1,0%
<i>Penicillium</i>	21	20,8%
<i>Rhizomucor</i>	7	6,9%
<i>Scedosporium</i>	2	2,0%
<i>Scopulariopsis</i>	1	1,0%
<i>Saksenea vasiformis</i>	8	7,9%
<i>Talaromyces marneffeii</i>	3	3,0%
<i>Trichoderma</i>	1	1,0%
<i>Trichothecium</i>	3	3,0%
<i>Ulocladium</i>	1	1,0%
<i>Verticillium</i>	7	6,9%
<b>Dermatófitos</b>	8	7,9%
<b>Fungos filamentosos não identificados</b>	28	27,7%

Diversos fungos foram isolados em todos os animais estudados, como se pode observar na Tabela 10. Neste estudo, apenas se efetuou a análise em raposas-vermelhas e sacarrabos, visto que, o número dos outros animais selvagens presentes na amostra não foi significativo.

O fungo mais prevalente em raposas-vermelhas foi *Mucor* (60,8%), seguido de *Aspergillus* (29,4%), principalmente *A. niger* (25,5%). Nesta espécie animal conseguiram-se identificar 16 géneros diferentes de fungos. Para além destes géneros, foram ainda isolados 3 fungos dermatófitos: dois *Trichophyton* spp. e um *Microsporum canis*.

O fungo mais prevalente em sacarrabos foi *Penicillium* (47,4%), seguido de *Mucor* (36,8%), tendo-se conseguido identificar 12 géneros diferentes de fungos. Para além destes, foram ainda isolados 5 fungos dermatófitos: três do género *Trichophyton* spp. e dois do género *Microsporum* spp..

No que diz respeito aos dermatófitos, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas quanto à obtenção de isolados ( $p=0,000$ ).

**Tabela 10.** Prevalência e distribuição da micobiota isolada relativamente às espécies de animais selvagens.

Micobiota	Coelho n=4	Fuinha n=5	Gineto n=3	Javali n=7	Lebre n=1	Lontra n=6	Ouriço n=2	Raposa n=51	Sacarrabos n=19	Texugo n=3
<b>Presença de fungos (p=0,002)</b>	1/4	5/5	1/3	4/7	1/1	3/6	2/2	47/51 (92,2%)	18/19 (94,7%)	2/3
<i>Absidia</i> (p=0,998)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	1/51 (2,0%)	0/19	0/3
<i>Alternaria</i> (p=0,731)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	3/51 (5,9%)	2/19 (10,5%)	0/3
<i>Aspergillus</i> (p=0,022)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	15/51 (29,4%)	0/19	0/3
<i>Aspergillus flavus</i> (p=0,998)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	1/51 (1,9%)	0/19	0/3
<i>Aspergillus fumigatus</i> (p=0,998)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	1/51 (1,9%)	0/19	0/3
<i>Aspergillus niger</i> (p=0,020)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	13/51 (25,5%)	0/19	0/3

<i>Apophisomyces</i> (p=0,947)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	0/51	1/19 (5,3%)	0/3
<i>Aureobasidium</i> (p=0,898)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	3/51 (5,9%)	0/19	0/3
<i>Cladosporium</i> (p=0,636)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	1/6	1/2	5/51 (9,8%)	2/19 (10,5%)	0/3
<i>Fusarium</i> (p=0,973)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	2/51 (3,9%)	0/19	0/3
<i>Geotrichum</i> (p=0,067)	0/4	0/5	1/3	0/7	1/1	1/6	1/2	5/51 (9,8%)	0/19	1/3
<i>Mucor</i> (p=0,008)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	31/51 (60,8%)	7/19 (36,8%)	0/3
<i>Onychocola</i> (p=0,998)	0/4	0/5	1/3	0/7	0/1	0/6	0/2	1/51 (1,9%)	0/19	0/3
<i>Penicillium</i> (p=0,019)	0/4	0/5	1/3	1/7	0/1	1/6	1/2	5/51 (9,8%)	9/19 (47,4%)	1/3
<i>Rhizomucor</i> (p=0,508)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	4/51 (7,8%)	1/19 (5,3%)	0/3
<i>Scedosporium</i> (p=0,992)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	1/51 (1,9%)	1/19 (5,3%)	0/3
<i>Scopulariopsis</i> (p=0,998)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	1/51 (1,9%)	0/19	0/3
<i>Saksenea</i> (p=0,862)	0/4	0/5	0/3	1/7	0/1	0/6	0/2	5/51 (9,8%)	2/19 (10,5%)	0/3
<i>Talaromyces marneffi</i> (p=0,116)	0/4	1/5	1/3	0/7	1/1	0/6	0/2	0/51	1/19 (5,3%)	0/3
<i>Trichoderma</i> (p=0,947)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	0/51	1/19 (5,3%)	0/3
<i>Trichothecium</i> (p=0,986)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	2/51 (5,3%)	1/19 (5,3%)	0/3
<i>Ulocladium</i> (p=0,998)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	1/51 (1,9%)	0/19	0/3
<i>Verticillium</i> (p=0,801)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	5/51 (9,8%)	2/19 (10,5%)	0/3
<b>Dermatófitos</b> (p=0,000)	0/4	0/5	0/3	0/7	0/1	0/6	0/2	3/51 (5,9%)	5/19 (26,3%)	0/3
<b>Fungos filamentosos não identificados</b> (p=0,109)	1/4	1/5	0/3	2/7	0/1	0/6	1/2	13/51 (25,5%)	10/19 (52,6%)	0/3

#### 4.4 *Talaromyces marneffe*

Neste trabalho, foi possível identificar o fungo *Talaromyces marneffe*, endêmico do sudeste Asiático, em 7 das 228 amostras colhidas. Todas as amostras na sua forma filamentosa foram convertidas à forma de levedura para confirmação do dimorfismo.

Quanto aos isolados em animais selvagens, na Figura 24, pode observar-se uma das amostras em questão, pertencente a um sacarrabos, macho, com 3 anos de idade, capturado no concelho de Penamacor, com condição corporal 4 (boa condição corporal numa escala de 1 a 5). Outra das amostras pertencia a uma fuinha, macho, com 2 anos de idade, encontrada também no concelho de Penamacor e com condição corporal 3 (condição corporal média numa escala de 1 a 5). É importante referir que, após cultura e PCR, verificou-se que esta fuinha estava também infetada com *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. A amostra de lebre pertencia a uma fêmea, com 2 anos de idade, capturada no concelho de Penamacor, com condição corporal 4.

Este mesmo fungo foi também encontrado na cavidade nasal de humanos, exclusivamente em indivíduos do sexo feminino, com 22, 54 e 58 anos. Nenhuma das participantes no estudo apresentava alergias ou qualquer outro tipo de doença respiratória, no entanto, todas admitiram ter convívio diário com animais. Também nenhuma das voluntárias se encontrava infetada pelo vírus da imunodeficiência humana, mas, no entanto, uma delas encontrava-se imunodeprimida devido a lúpus eritematoso.

No que diz respeito aos animais domésticos, verificou-se o crescimento de *T. marneffe* num felino, macho, com 1 ano de idade. Este animal não pertencia a nenhum dos indivíduos infetados pelo mesmo fungo e após inquirir os donos verificou-se que não apresentava nenhum diagnóstico clínico de imunodepressão.



**Figura 24.** Características macroscópicas e microscópicas de *T. marneffe*.

## 4.5 Biologia molecular

Neste trabalho apenas algumas amostras foram submetidas a testes genéticos (PCR), por se considerarem, além das mais patogénicas, as primeiras a serem isoladas em Portugal. Assim, para além da deteção microbiológica, foi também feita a confirmação através de características genéticas.

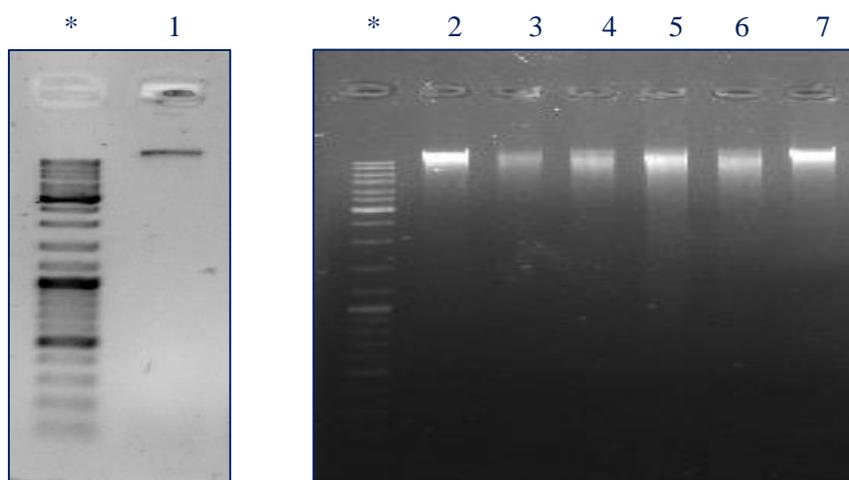
Na Tabela 11, estão as amostras nas quais foi possível isolar *T. marneffe* por técnicas microbiológicas e que foram posteriormente submetidas a PCR, e o animal a partir do qual o fungo foi isolado.

**Tabela 11.** Descrição das amostras submetidas a PCR.

<b>Código amostra</b>	<b>Animal</b>	<b>Fungo</b>
DSR 1987	Sacarrabos	<i>T. marneffe</i>
DF 650	Fuinha	<i>T. marneffe</i>
DLE 652	Lebre	<i>T. marneffe</i>
HN21	Humano	<i>T. marneffe</i>
HN43	Humano	<i>T. marneffe</i>
HN72	Humano	<i>T. marneffe</i>
D32	Felino	<i>T. marneffe</i>

### 4.5.1 DNA genómico

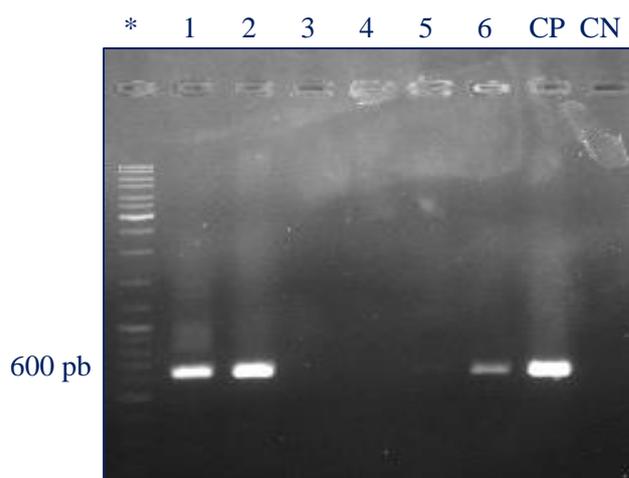
Para se verificar a qualidade do DNA fúngico extraído, foi feita uma análise em gel de agarose a 1%. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 25. Pela visualização dos géis verifica-se que o DNA genómico está íntegro, e em quantidade suficiente para a identificação molecular, o que nos permite concluir que a extração do mesmo foi bem-sucedida.



**Figura 25.** Géis de DNA genómico. **Legenda:** \* - Marcador de peso molecular; 1 – DSR 1987; 2 – DF 650; 3 – DLE 652; 4 – HN21; 5 – HN43; 6 – HN72; 7 – D32.

#### 4.5.2 1ª Reação Nested-PCR

Este tipo de PCR baseia-se em duas reações com “primers” que amplificam sequências do gene 18S rRNA. A primeira amplificação é realizada com “primers” específicos para fungos (RRF1 e RRH1), resultando numa banda de aproximadamente 600pb. Esta banda específica, pode ser observada no gel da Figura 26.

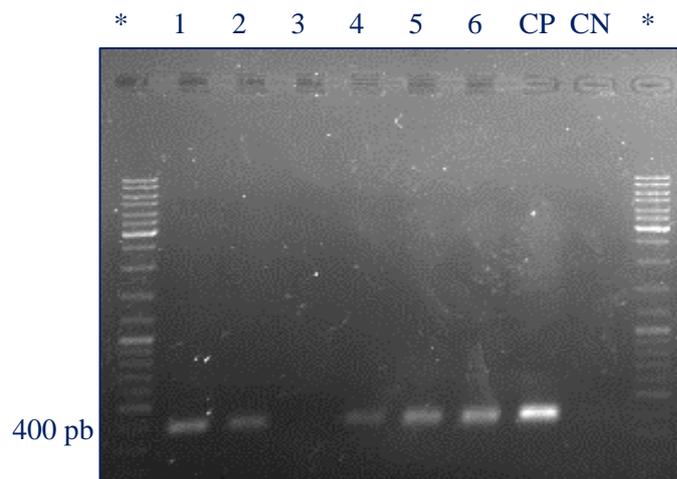


**Figura 26.** Gel da 1ª reação de Nested-PCR. **Legenda:** \* - Marcador de peso molecular; 1 – DSR 1987/12; 2 – DF 650/10; 3 – DLE 652/10; 4 – HN21; 5 – HN43; 6 – HN72; CP – Controlo Positivo; CN – Controlo Negativo.

### 4.5.3 2ª Reação Nested-PCR

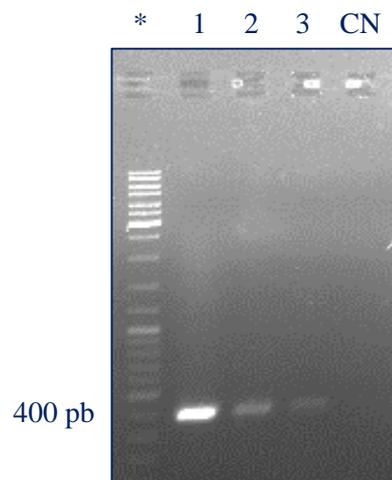
Na segunda reação, os “primers” (Pm1 e Pm2), amplificam um fragmento de 400pb no caso de o fungo em questão ser *T. marneffei*, o que não acontece caso se esteja na presença de outro fungo, sendo estes “primers” considerados específicos para *T. marneffei*.

Pela visualização do gel da Figura 27 verifica-se que, todas as amostras amplificaram na região dos 400pb, à exceção da amostra número 3.



**Figura 27.** Gel da 2ª reação de Nested-PCR. **Legenda:** \* - Marcador de peso molecular; 1 – DSR 1987/12; 2 – DF 650/10; 3 – DLE 652/10; 4 – HN21; 5 – HN43; 6 – HN72; CP – Controlo Positivo; CN – Controlo Negativo.

Devido à aparente ausência de banda no poço relativo à amostra 3, ambas as reações da Nested-PCR foram repetidas, podendo observar-se o gel resultante da segunda reação na Figura 28.



**Figura 28.** Gel da repetição da 2ª reação de Nested-PCR. **Legenda:** \* - Marcador de peso molecular; 1 – DSR 1987; 2 – DF 650; 3 – DLE 652; CN – Controlo Negativo.

## 5. Discussão

De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, raros são os artigos abrangendo a temática de rastreios de fungos filamentosos em animais selvagens sendo, por isso, dificultada a recolha de dados estatísticos que nos permitam fazer a comparação de resultados obtidos. No entanto, sabe-se que o interesse nos animais selvagens tem vindo a aumentar nos últimos tempos e existem várias razões para tal. A principal é, sem dúvida, o aumento da preocupação da população devido às doenças infecciosas que podem ser transmitidas aos seres humanos (Kruse *et al.*, 2004). Outra razão, é o aumento da documentação relativa a estes mesmos animais, nomeadamente, na epidemiologia das doenças de animais domésticos (Gortázar *et al.*, 2007). A terceira razão reside no facto de as doenças serem uma crescente ameaça para as populações animais (Daszak *et al.*, 2000), sendo um exemplo, o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, pertencente ao filo Chytridiomycota, que está associado a um decréscimo das populações de anfíbios (James *et al.*, 2009).

Segundo o estudo de Molina-López *et al.* (2012), que se baseou no rastreio de fungos filamentosos em ouriços, concluiu-se que os géneros mais prevalentes foram *Cladosporium* (79,1%), *Penicillium* (74,7%), *Alternaria* (64,8%) e *Rhizopus* (63,7%). Quando comparado com este trabalho, apesar de o número de amostras de ouriço ser limitado (n=2), verifica-se a concordância no isolamento dos dois géneros mais prevalentes.

Ainda no que diz respeito aos animais selvagens, existem alguns artigos que fazem a análise da presença de dermatófitos. Num estudo de Mantovani *et al.* (1982), a prevalência de dermatófitos em raposas-vermelhas foi de 17,9%, uma percentagem superior à obtida neste trabalho (5,9%). O estudo de Mantovani analisou também outros animais comuns a este trabalho, como ouriços e lebres, os quais deram positivo para dermatófitos. No presente trabalho estas espécies animais não tiveram crescimento de dermatófitos, facto que se poderá dever ao limitado número de amostras (n=2) e (n=1), respetivamente. Tanto neste trabalho como no artigo citado foram testadas fuinhas, mas em ambos os casos as amostras foram negativas para dermatófitos, provavelmente também pelo limitado número de amostras (n=5) e (n=3).

Neste trabalho verificou-se ainda uma elevada percentagem de isolamento de fungos dermatófitos em sacarrabos (26,3%), no entanto, não existem artigos que permitam fazer a comparação.

Com a elaboração deste trabalho, verificou-se que os géneros fúngicos mais prevalentes foram *Mucor*, *Penicillium* e *Aspergillus*, fungos estes que se encontram em elevadas

quantidades no ambiente extradomiciliar em Portugal (Oliveira *et al.*, 2010). É curioso *Cladosporium* aparecer como o quarto género mais prevalente, com crescimento em apenas 8,9% dos animais selvagens submetidos ao estudo, uma vez que, este fungo costuma ser dos géneros mais prevalentes, se não mesmo o mais prevalente (de Ana *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2010; Okten e Asan, 2012; Shams-Ghahfarokhi *et al.*, 2014). Esta percentagem tão baixa poderá ser justificada pela altura em que as colheitas de pelo foram realizadas, uma vez que, várias pesquisas indicam que *Cladosporium* se encontra em maiores concentrações no ar durante o outono. Um exemplo é o trabalho de de Ana *et al.* (2005) que mostra que o fungo em questão é mais comum no outono (94%), e menos comum na primavera (63%). Também o trabalho de Ponce-Caballero *et al.* (2013) mostra a mesma relação, havendo crescimento deste fungo em cerca de 90% das colheitas realizadas no mês de Outubro e, em apenas 10% das colheitas levadas a cabo no mês de Maio.

Em 2011, Kuiken *et al.*, desenvolveram um trabalho bastante interessante, que se baseou na criação de uma rede europeia de vigilância de animais selvagens. Após recolhidos os dados em 25 países, procederam à análise, concluindo que Portugal era o terceiro país com mais casos de animais com patologias, nomeadamente bacterianas, micológicas e víricas por  $\text{km}^2 \times 10^4$ . Estes resultados mostram a elevada importância dos rastreios, principalmente porque inferem que os animais selvagens são potenciais reservatórios de doenças infecciosas, havendo necessidade um controlo mais apertado, no que diz respeito à saúde destes animais.

Em relação às amostras nasais, neste trabalho os géneros mais prevalentes foram *Penicillium* (49,3%), *Mucor* (31,5%), *Cladosporium* (26,0%) e *Aspergillus* (17,8%). Três dos quatro géneros são coincidentes com o trabalho de Buzina *et al.*, (2003) e Sellart-Altisent *et al.* (2007) que afirmam que os géneros mais prevalentes nos seus estudos foram *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Alternaria*. Estes fungos são os que causam, mais frequentemente, alergias respiratórias (Sellart-Altisent *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2011).

Nas amostras nasais foi também isolado um fungo que se caracteriza por ser causador da degradação de plantas e frutas (Camili *et al.*, 2007; Camatti-Sartori *et al.*, 2011), *Botrytis cinerea*. Foi possível isolá-lo num indivíduo do sexo masculino e num do sexo feminino, ambos com idade superior a 41 anos. Sendo este fungo considerado necrotrófico, principalmente para a fruta, procurou-se inquirir os indivíduos sobre a sua proximidade com o campo, para que fosse possível justificar a existência deste fungo na cavidade nasal dos mesmos. Após a descoberta do historial de ambos os indivíduos, verificou-se que ambos trabalharam e frequentaram zonas repletas de videiras durante grande parte da sua vida, corroborando a suspeita de que teriam um

elevado contato com fruta afetada pelo fungo. Num estudo realizado por Buzina *et al.* (2003) foi também isolado este fungo através de lavagem nasal de dois pacientes com CRS (Rinossinusite crónica), em que um deles habitava numa região vinícola e o outro próximo de um campo de produção de fruta e vinho.

Neste trabalho, a prevalência de crescimento fúngico foi superior em indivíduos do sexo feminino comparativamente com os indivíduos do sexo masculino, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas, sendo este facto corroborado com o trabalho de Sellart-Altisent *et al.* (2007).

Quanto à idade, a prevalência de crescimento fúngico foi superior em indivíduos com a mesma idade ou superior a 41 anos (52,4%) comparativamente com os indivíduos com idades compreendidas entre 21 e 40 anos (31,7%) e com idade igual ou inferior a 20 anos (15,9%), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas. Segundo a pesquisa realizada não existem artigos que abordem as diferentes prevalências de crescimento fúngico de acordo com as diferentes faixas etárias, não sendo assim possível a comparação de resultados.

No que diz respeito às alergias, um estudo realizado por Buzina *et al.* (2003) obteve uma percentagem de crescimento fúngico em indivíduos saudáveis de 91,3%. Outro estudo realizado por Ponikau *et al.* (1999) obteve 100% de crescimento fúngico para o mesmo grupo de indivíduos. Existe ainda um estudo de Sellart-Altisent *et al.* (2007) que, para o mesmo tipo de indivíduos, reporta um crescimento fúngico de 64,4%. Neste trabalho, a percentagem relativa aos indivíduos saudáveis foi de 88,2%, encontrando-se dentro da gama dos valores obtidos pelos outros autores.

Relativamente aos sujeitos alérgicos, a percentagem de crescimento fúngico foi de 81,8%. No estudo de Sellart-Altisent *et al.* (2007) a percentagem de crescimento fúngico foi de 41,7%. Tal como no estudo anteriormente citado, no presente trabalho, os indivíduos com alergias também apresentaram uma percentagem de prevalência fúngica inferior à dos indivíduos saudáveis. Esta situação pode justificar-se pela rinorreia persistente neste tipo de indivíduos, o que fará com que, através da mesma, haja eliminação dos elementos fúngicos (Sellart-Altisent *et al.*, 2007).

No estudo anteriormente mencionado verificaram-se as seguintes frequências fúngicas: *Cladosporium* (26,3% em saudáveis; 29,4% em alérgicos), *Penicillium* (25,3%; 20,6%), *Aspergillus* (12,1%; 11,7%) e *Alternaria* (7,6%; 11,7%). Neste trabalho as frequências foram: *Cladosporium* (27,5% em saudáveis; 22,7% em alérgicos), *Penicillium* (58,8%; 27,3%), *Aspergillus* (19,6%; 13,6%) e *Alternaria* (2,0%; 4,5%). Comparando ambas as frequências,

verificam-se bastantes semelhanças, principalmente no facto de a frequência fúngica dos indivíduos alérgicos ser sempre inferior à dos saudáveis, com exceção do género *Cladosporium* no trabalho de Sellart-Altisent *et al.* (2007). Apenas o género *Alternaria*, em ambos os trabalhos, apresenta uma frequência fúngica superior para os indivíduos alérgicos em relação aos indivíduos saudáveis. O primeiro acontecimento pode ser explicado pelo facto de o fungo *Cladosporium* ser considerado um fungo alergénico (Garrett *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 2002; Simon-Nobbe *et al.*, 2008). Segundo os estudos anteriores, verificou-se um maior risco de sensibilização a alergénios quando os níveis de esporos de *Cladosporium* eram elevados dentro das habitações.

Em relação ao género *Alternaria*, é normal verificar-se uma percentagem de crescimento do mesmo superior em indivíduos alérgicos, uma vez que, é um potente agente alérgico. Em contraste com o pólen, os esporos deste fungo podem causar não só alergia do tipo I, mas também um grande número de outras doenças, incluindo sinusites alérgicas, pneumonite de hipersensibilidade, rinite alérgica e asma (Havaux *et al.*, 2004; Simon-Nobbe *et al.*, 2008). A exposição prolongada a estes mesmos esporos pode desencadear asma severa e representa um fator de risco para a falência respiratória (Havaux *et al.*, 2004).

Neste trabalho verificou-se também uma elevada percentagem de crescimento da levedura *Rhodotorula* em indivíduos saudáveis (13,7%), sendo mesmo o quinto género mais prevalente. Segundo a pesquisa bibliográfica efetuada, os estudos de Sellart-Altisent *et al.*, (2007) e de Eidi *et al.*, (2016) mostram uma percentagem de crescimento bastante inferior, de apenas 3,8% e 3,6%, respetivamente. Sellart-Altisent *et al.* (2007) e Cui *et al.* (2013), efetuaram estudos com indivíduos alérgicos, obtendo uma percentagem de crescimento de *Rhodotorula* de 2,9%. No presente trabalho, a percentagem de *Rhodotorula* obtida para o mesmo grupo de indivíduos foi de 4,5%.

Existe também outro facto curioso que é a percentagem de *Mucor* isolado neste trabalho (27,5% em saudáveis; 40,1% em alérgicos). Após extensa pesquisa bibliográfica, não se verificou nenhum isolamento deste género fúngico na cavidade nasal de indivíduos, quer saudáveis, quer alérgicos, em artigos publicados. No entanto, o facto de estas percentagens serem tão elevadas é preocupante, visto que, *Mucor* pode causar mucormicose, uma infeção rara para indivíduos saudáveis, mas, no entanto, com taxas de mortalidade bastante elevadas para indivíduos imunodeprimidos, apesar dos avanços realizados no seu diagnóstico e tratamento (Kameswaran e Raghunandhan, 2009). Esta doença é assim classificada como uma infeção oportunista, que afeta preferencialmente pacientes com diabetes mellitus, neutropenia,

cancro, que o isolamento de *Mucor* foi estatisticamente superior em indivíduos que conviviam diariamente com animais de companhia. Segundo a pesquisa bibliográfica realizada não existem artigos que abordem este tema e, portanto, fica assim impossibilitada a comparação dos resultados obtidos. No entanto, pela análise dos resultados obtidos, verifica-se que *Mucor* é o terceiro género mais prevalente no pelo de ambos os animais de companhia submetidos a este estudo, podendo assim haver uma possível relação entre os valores obtidos para as amostras nasais de humanos e as amostras de pelo dos animais domésticos.

Quanto aos animais domésticos, observou-se crescimento fúngico em 96,3% dos animais, sendo este muito semelhante em cães e em gatos. O estudo da autoria de Nichita e Marcu (2010) também em animais domésticos, documenta um crescimento fúngico na ordem dos 85,14%.

Os géneros fúngicos mais prevalentes em cães foram *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* e *Rhodotorula*. Segundo a pesquisa bibliográfica realizada verificam-se bastantes semelhanças com este trabalho no que diz respeito aos géneros fúngicos mais prevalentes no pelo de canídeos. A partir dos trabalhos de Cabañes *et al.* (1996), Stojanov *et al.* (2007), Nichita e Marcu (2010) verifica-se que os géneros mais prevalentes são *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Mucor*. Segundo Gambale *et al.* (1987), Cabañes *et al.* (1996) e Lunardi *et al.* (2006) as leveduras do género *Rhodotorula*, também são integrantes da microbiota normal da pele de canídeos, havendo também alguns estudos que apontam esta levedura como um agente etiológico emergente em quadros de infeção humana, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Samonis *et al.*, 2001; Lunardi *et al.*, 2006; Holanda *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2007; Wirth e Goldani, 2012; Tlamçani e Er-rami, 2013).

O género fúngico mais prevalente em gatos foi *Cladosporium*, seguido de *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*. Segundo vários estudos realizados por Moriello e DeBoer (1991), Gambale *et al.* (1993), Cabañes (2000), Paixão *et al.* (2001) e Scott *et al.* (2001) verificam-se bastantes semelhanças, sendo os géneros mais comuns em pelos de felinos *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhodotorula*.

Neste estudo isolaram-se 5 dermatófitos, sendo a prevalência de isolamento de 9,3%: 7,1% em cães e 11,5% em gatos. Nos estudos de Cabañes *et al.* (1996), Stojanov *et al.* (2007) e Nichita e Marcu (2010) foram documentadas prevalências de dermatófitos de 8,1%, 11,9% e 33,66%, respetivamente. Em vários artigos observa-se que a prevalência de dermatófitos em gatos é superior à dos cães e, normalmente, apresenta uma percentagem superior a 20% (Nichita e Marcu, 2010). Dos animais amostrados, 5 apresentavam lesões do foro dermatológico, dos

quais 3 eram cães e 2 eram gatos. No entanto, nenhum dos animais dos quais foram isolados dermatófitos apresentava lesões visíveis, sendo assim considerados portadores assintomáticos. Segundo o estudo de Cafarchia *et al.* (2006) até 50% dos seres humanos expostos a felinos sem lesões cutâneas, podem ser portadores de infecções e desenvolver lesões tegumentares. Estas situações em que estamos perante um animal infetado mas sem sinais clínicos, são as que representam maior risco de contágio uma vez que não há qualquer tipo de prevenção, podendo eventualmente ser desenvolvidas microepidemias familiares. Contudo, mesmo que os humanos tenham contacto direto com o animal infetado, não implica necessariamente que este venha a desenvolver a doença (Cafarchia *et al.*, 2006; Natale *et al.*, 2007).

Todos os dermatófitos isolados eram do género *Microsporum*: dois *Microsporum nanum*, um *Microsporum gypseum* e dois *Microsporum* spp.. No entanto, de acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, observa-se que *M. canis* é o dermatófito mais frequentemente isolado em animais domésticos, sendo responsável por 95% das dermatofitoses em gatos e 65% das infecções em cães (Moriello e Deboer, 1991; Cabañes *et al.*, 1997; Paixão *et al.*, 2001; Brillhante *et al.*, 2003; Bernardo *et al.*, 2005; Natale *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2008; Nichita e Marcu, 2010). Assim, de acordo com as elevadas prevalências documentadas nos artigos científicos referentes a esta espécie de *Microsporum*, verifica-se a elevada possibilidade de os 2 dermatófitos cuja espécie não foi possível identificar, sejam *M. canis*. Já *M. nanum*, segundo Chermette (2008), Nweze (2011) e Mattei *et al.* (2014), é maioritariamente isolado em porcos. Todavia, neste trabalho, este fungo foi isolado num canídeo e num felídeo. Coelho *et al.* (2008) e Ilhan *et al.* (2016) também isolaram este mesmo dermatófito num felino.

Neste trabalho, *M. gypseum* foi isolado num felino, apesar de, segundo a literatura, este dermatófito ser mais comumente isolado em coelhos e, por vezes, em cavalos. No entanto, Mancianti *et al.* (2003), Coelho *et al.* (2008), Beraldo *et al.* (2011) e Roshanzamir *et al.* (2016) também isolaram o mesmo dermatófito em felídeos e canídeos.

Alguns trabalhos, como por exemplo, os de Marchisio *et al.* (1995), Mancianti *et al.* (2003), Cafarchia *et al.* (2006), Chermette (2008) e Greene (2012) constataram que a dermatofitose é mais encontrada em felinos jovens, provavelmente, por não estar a imunidade completamente desenvolvida. No presente trabalho, dois dos dermatófitos foram isolados em animais jovens (1 ano de idade), um num canídeo adulto (2 anos de idade) e os restantes dois em animais idosos (12 anos de idade). De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada não se encontraram artigos que demonstrem uma prevalência de dermatófitos semelhante à deste trabalho, tanto no que diz respeito aos animais jovens, como aos animais idosos. No entanto, o

facto de se obter uma prevalência de 40% para os animais idosos, pode explicar-se pela debilidade do sistema imunitário devido à idade avançada, que os torna mais suscetíveis a doenças. A literatura regista também algumas evidências de predisposição relacionada ao género dos animais. Sparkes *et al.* (1993), Marchisio *et al.* (1995), Cabañes *et al.* (2000) e Chermette (2008) afirmam que é maior a probabilidade de isolamento de dermatófitos em machos em relação a fêmeas, embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas. No presente trabalho quatro dos cinco dermatófitos foram isolados de machos, corroborando assim os estudos anteriores.

Num âmbito da investigação, isolaram-se os fungos das amostras dos proprietários (zaragatoas nasais) e dos respetivos animais de companhia, de forma a verificar se haveria concordância dos mesmos em alguns géneros fúngicos. O valor entre parêntesis significa o número de vezes em que os géneros fúngicos se isolaram em simultâneo: *Penicillium* (18), *Mucor* (12), *Cladosporium* (9), *Aspergillus* (5), *Alternaria* (1). Tendo em conta que existiam 56 indivíduos com animais de companhia, verificamos que os géneros fúngicos isolados tanto na cavidade nasal de humanos como no pelo dos respetivos animais domésticos foi bastante coincidente. No entanto, não podemos desvalorizar o facto de estes serem os géneros fúngicos mais comuns nos ambientes intra e extradomiciliares (Oliveira *et al.*, 2010; Yassin e Almouqatea, 2010; Khan e Karuppayil, 2012; Pavan e Manjunath, 2014; Shams-Ghahfarokhi *et al.*, 2014), não podendo assim fazer a associação direta de que os fungos presentes na mucosa nasal advêm do convívio com animais.

No que diz respeito aos animais selvagens a partir dos quais foi isolado o fungo *T. marneffe*, verificou-se que, apesar de serem de diferentes espécies, todos se localizavam na faixa etária de 2-3 anos de idade. Analisando agora a área onde foram encontrados, verifica-se que todos os animais que possuíam o fungo em questão, foram capturados no concelho de Penamacor. Existe ainda outra particularidade, a condição corporal, que em todos os animais foi classificada de 4, com exceção de uma fuinha que possuía condição corporal 3. Este acontecimento pode dever-se ao facto de esta estar também infetada com *Mycobacterium avium* subspécies *paratuberculosis* (Map). A presença de Map nos tecidos foi confirmada por PCR, pelas entidades que facultaram as amostras para este estudo. Segundo a pesquisa bibliográfica nunca foi documentada a presença de *T. marneffe* em animais selvagens, sendo estes os primeiros casos em sacarrabos, fuinhas e lebres. Em humanos está documentada a infeção por Complexo *Mycobacterium avium* e o isolamento simultâneo de *T. marneffe*. No entanto, de acordo com a pesquisa efetuada este é também o primeiro caso desta associação em animais.

Foi também encontrado este mesmo fungo na cavidade nasal de humanos, exclusivamente em indivíduos do sexo feminino, com 22, 54 e 58 anos. Nenhuma das voluntárias apresentava alergias ou qualquer outro tipo de doença respiratória, no entanto, todas elas admitiram ter convívio diário com animais. É de referir que após a análise do pelo, verificou-se que nenhum dos animais de companhia destes indivíduos estava infetado. Nenhuma das mulheres infetadas com o fungo patogénico se encontrava infetada pelo VIH, no entanto, uma das voluntárias encontrava-se imunodeprimida devido a lúpus. Existem estudos que indicam que um indivíduo imunodeprimido com lúpus eritematoso poderá ser mais suscetível a *T. marneffe* (Jayanetra *et al.*, 1984; Lo *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2010; Chong *et al.*, 2012). Pelos resultados obtidos com estes estudos verificou-se que existe variabilidade no que diz respeito à idade dos pacientes (23, 25, 32, 32, 38, 40, 46, 66), em relação ao período de tempo decorrido desde que contraíram a doença (3 meses, 4 meses, 1 ano, 3 anos, 10 anos, 23 anos, 24 anos e um dos pacientes encontrava-se desprovido desta informação clínica) e à percentagem de pacientes com leucopenia (50% positivos, 25% negativos e 25% não dispunham desta informação). Uma das semelhanças entre os pacientes era o facto de serem residentes do sudoeste asiático, o que pode ser considerado normal, uma vez que, *T. marneffe* é endémico desta região. É também de referir o facto de 75% dos pacientes documentados ser do sexo feminino e 50% dos pacientes terem falecido devido a esta infeção.

Segundo a pesquisa efetuada, existem vários casos reportados de pacientes com VIH que viajaram para o sudoeste asiático e só posteriormente foram diagnosticados com infeção por *T. marneffe* na Europa, nos Estados Unidos da América, no Japão e na Austrália (Rimek *et al.*, 1999; Volberding *et al.*, 2012; Igbinsosa *et al.*, 2015). Os casos documentados no presente trabalho, são os primeiros casos de isolamento de *T. marneffe* na cavidade nasal de humanos que não se encontram infetados pelo vírus da imunodeficiência humana e que nunca visitaram o sudoeste Asiático. O facto de se ter isolado um fungo endémico do continente Asiático em Portugal, pode dever-se à globalização. A intensificação do comércio internacional e viagens quebraram muitas barreiras naturais causando uma redistribuição sem precedentes de muitos organismos (Tibayrenc, 2011). Concomitantemente, há evidências crescentes de que estas alterações globais desempenham um papel crucial no que concerne ao aparecimento de doenças infecciosas em seres humanos (Tatem *et al.*, 2006), animais selvagens (Daszak *et al.*, 2000) e animais domésticos (Cleaveland *et al.*, 2001).

Pela pesquisa realizada, sabe-se que, existe uma forte possibilidade de os humanos serem infetados através da inalação dos esporos do agente infeccioso e muito raramente por

contacto direto com o animal (Wu *et al.*, 2008; Nor-Hayati *et al.*, 2012). Assim, talvez fosse interessante efetuar uma colheita de sangue das voluntárias nas quais foi possível isolar *T. marneffe* na cavidade nasal, e de seguida realizar uma hemocultura, uma vez que, apesar de ainda não se conhecer bem o mecanismo de infecção deste fungo, verifica-se uma forte possibilidade de o mecanismo de entrada para o organismo se dar pela inalação dos esporos, seguindo-se da sua disseminação pela corrente sanguínea. O tempo de incubação da infecção por *T. marneffe* ainda não foi bem definido, no entanto, está documentado um caso de um paciente, habitante de uma área não endémica, que mostrou estar infetado por este fungo 11 anos após visitar Hong Kong. Este caso sugere-nos a possibilidade de um longo tempo de latência com consequente reativação (Wong e Wong, 2011), mostrando-nos assim a importância que teria a realização de hemocultura, uma vez que, os sintomas podem demorar vários anos a manifestar-se, havendo assim um diagnóstico tardio.

No que diz respeito aos animais domésticos, verificou-se o crescimento de *T. marneffe* num felino, macho, com 1 ano de idade. Após alguma pesquisa, verifica-se que este é o primeiro caso de isolamento deste fungo patogénico num felino. O único animal onde já tinha sido documentado o isolamento e que tem contacto com humanos, foi em cães vadios na Tailândia (Chaiwun *et al.*, 2011). Outra característica importante é o facto de o animal de onde foi isolado *T. marneffe* neste trabalho não estar infetado com o vírus da imunodeficiência felina nem sequer apresentar nenhum diagnóstico clínico de imunodepressão. Apesar de não existir bibliografia que remeta para este tópico e que nos permita comparar resultados, é importante referir que este isolamento tem que ser levado em consideração, uma vez que, este fungo é considerado um oportunista e que, portanto, deveria apenas infetar indivíduos e animais imunodeprimidos. No entanto, nos últimos anos, têm sido reportados alguns casos de infeções por *T. marneffe* em humanos saudáveis. Com este trabalho, verifica-se que este fungo poderá estar a começar a infetar ou colonizar também animais de companhia saudáveis.

Quanto à biologia molecular, foi realizado uma análise para se verificar a qualidade e quantidade do DNA após o procedimento de extração, e foi possível observar-se bandas bem definidas (confirmando a integridade) e com DNA suficiente para prosseguir para o PCR específico. Assim, posteriormente foi realizada a primeira reação da Nested-PCR, com “primers” (RRF1 e RRH1) específicos para fungos, resultando no aparecimento de uma banda de aproximadamente 600pb. No presente trabalho, não foi possível obter esta banda para todas as amostras, todavia seria expectável obtê-las uma vez que todas as amostras analisadas eram de fungos (*T. marneffe*). No entanto, de acordo com a pesquisa efetuada, existem alguns autores

que reportam o mesmo problema na amplificação de bandas a 600pb nesta primeira reação, o que pode significar menos quantidade de DNA que não permite a visualização no gel de agarose.

Apesar da falha de bandas na primeira reação, a segunda reação, utilizando os “primers” (Pm1 e Pm2), específicos para *T. marneffe*i foi bem-sucedida, amplificando fragmentos de 400pb em 7 das 7 amostras testadas. O facto de haver amplificação apenas na segunda reação da Nested-PCR poderá estar relacionado com baixas concentrações de DNA, uma vez que, após ser sujeito à segunda reação de PCR, dá-se uma re-amplificação do DNA, obtendo-se assim uma maior quantidade do mesmo e consequentemente torna-se possível a observação da banda específica a 400pb.

Para garantir e comprovar a especificidade e sensibilidade da técnica, foram utilizadas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* em alguns testes, para verificar se haveria amplificação de fragmentos, quer na zona dos 600pb quer na zona dos 400pb. Como seria de esperar, apenas se observou amplificação na primeira reação da Nested-PCR, isto é, quando se utilizam “primers” específicos para fungos. Quanto à segunda reação, a banda específica apenas foi visível nos poços em que foi depositado material genético de *T. marneffe*i. Após a análise dos resultados obtidos, verifica-se que esta técnica poderá ser aplicada para a confirmação do diagnóstico da infeção causada por este fungo, uma vez que, é possível obter resultados com elevada especificidade e sensibilidade num curto período de tempo.

## 6. Conclusão

Com este trabalho obtiveram-se percentagens de crescimento fúngico bastante satisfatórias, na ordem dos 83,2%, 86,3% e 96,3% nas amostras de animais selvagens, amostras nasais e amostras de animais domésticos, respetivamente. De acordo com estes valores e sabendo que apenas uma pequena percentagem de fungos não foi possível identificar, pode concluir-se que os meios de cultura utilizados foram adequados bem como todas as técnicas de identificação macroscópica e microscópica.

No rastreio realizado aos animais selvagens foi possível identificar 22 géneros fúngicos enquanto que no rastreio efetuado aos animais domésticos foram identificados 11 géneros fúngicos, mostrando-nos assim a diversidade da micobiota existente no pelo dos mesmos. Dentro destes géneros isolados, estão incluídos fungos dermatófitos, agentes causadores da dermatofitose. Estes têm a capacidade de degradar a queratina, que pode ser encontrada no pelo dos animais, obtendo assim nutrientes. Neste trabalho, todos os animais de companhia de onde foram isolados dermatófitos eram assintomáticos. Através dos resultados obtidos verifica-se a importância da realização de rastreios, tanto em animais selvagens como em animais domésticos. Este tipo de rastreios permite não só dar a conhecer a micobiota presente no pelo dos animais bem como minimizar os riscos de infeção provenientes dos fungos que se encontram no pêlo dos mesmos e alertar a população para os riscos associados ao contato com animais infetados.

Também nos humanos foi obtida bastante diversidade, tendo-se isolado 14 géneros fúngicos. Neste trabalho, tal como nos artigos científicos publicados, a percentagem de crescimento fúngico obtida para indivíduos saudáveis foi superior à dos sujeitos alérgicos. Este acontecimento poderá dever-se à rinorreia persistente neste tipo de indivíduos, o que fará com que, através da mesma, haja eliminação dos elementos fúngicos. Este rastreio permitiu o conhecimento da micobiota existente na mucosa nasal de humanos, um tópico que até ao momento não foi muito desenvolvido.

*Talaromyces marneffe* foi identificado por técnicas microbiológicas em 7 das 228 amostras submetidas a este estudo: em três animais selvagens, três amostras nasais de humanos e num animal doméstico. Posteriormente todos estes isolados foram confirmados por PCR, uma técnica de biologia molecular com elevada especificidade e sensibilidade. Assim conclui-se que futuramente esta técnica poderá ser aplicada para a confirmação do diagnóstico da infeção causada por este fungo, uma vez que é possível obter resultados num curto período de tempo.

Como perspectivas futuras será ainda necessário realizar vários estudos sobre o fungo patogénico *Talaromyces marneffe*, nomeadamente, clarificar o seu mecanismo de infeção e efetuar mais testes para descobrir potenciais reservatórios. De acordo com a informação disponível até ao momento, sabe-se que o mecanismo de entrada deste fungo é através da inalação de esporos, disseminando-se depois através da corrente sanguínea. Sabendo que foi isolado em três amostras nasais e tendo em conta o seu mecanismo de infeção, seria interessante realizar uma colheita sanguínea das três voluntárias em questão, de forma a saber se este mesmo fungo já se encontraria na corrente sanguínea. Por outro lado, este fungo foi encontrado num felino sem qualquer tipo de imunodepressão o que pode sugerir que os gatos podem ser potenciais reservatórios. Como tal, deveria ser aumentada a amostragem para se obterem valores mais significativos e a confirmação de que estes podem desempenhar o papel de reservatório.

Este estudo possui limitações no que diz respeito ao número de amostras relativas à espécie de cada animal selvagem. Este é um fator muito difícil de controlar devido à logística associada à colheita de amostras e ainda tendo em conta que os animais sujeitos ao estudo foram capturados já mortos, não estando assim a seleção das espécies animais dependente da nossa equipa de investigação.

## 7. Referências Bibliográficas

- Ahmad, I.; Owais, M.; Shahid, M.; Aqil, F. (2010). *Combating Fungal Infections: Problems and Remedy*. Springer, Berlin, Germany. ISBN: 978-3-642-12172-2.
- Almeida, S.R. (2012). Apostila de Micologia Clínica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil. Retrieved from: [www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf](http://www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf). Consulted in June, 2016.
- Anaissie, E.J.; McGinnis, M.R.; Pfaller, M.A. (2009). *Clinical Mycology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Churchill Livingstone, Philadelphia, United States of America. ISBN: 978-1-4160-5680-5.
- Baradkar, V.; Kumar, S.; Kulkarni, S.D. (2009). *Penicillium marneffei*: The pathogen at our door step. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, **75**:619–20.
- Berger, S. (2016). *Miscellaneous Invasive Fungi: Global Status*. GIDEON Informatics Inc, Los Angeles, United States of America. ISBN: 978-1-4988-0925-2.
- Bernardo, F.; Lança, A.; Guerra, M.M.; Martins, H.M. (2005). Dermatofitos isolados de animais de companhia (cão e gato), em Lisboa, Portugal (2000-2004). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **100**:85-88.
- Beraldo, R.M.; Gasparoto, A.K.; Siqueira, A.M.; Dias, A.L.T. (2011). Dermatophytes in household cats and dogs. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, **18**(2/3):85-91.
- Bhatia R.; Ichhpujani, R.L. (2008). *Essentials of Medical Microbiology*. 4<sup>th</sup> Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, India. ISBN: 81-8448-154-3.
- Bioron (2015). Taq Master Mix. Retrieved from: <http://www.bioron.net/>. Consulted in August, 2016.
- Boss, M.J.; Day, D.W. (2001). *Air Sampling and Industrial Hygiene Engineering*. CRC Press, Florida, United States of America. ISBN: 1-56670-417-0.
- Brilhante, R.S.N.; Cavalcante, C.S.P.; Soares-Junior, F.A.; Cordeiro, R.A.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. (2003). High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: Epidemiological and diagnostic features. *Mycopathologia*, **156**:303–308.
- Buzina, W.; Braun, H.; Freudenschuss, K.; Lackner, A.; Habermann, W.; Stammberger, H. (2003). Fungal biodiversity – as found in nasal mucus. *Medical Mycology*, **41**:149–161.
- Cabañes, F.J.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G. (1996). Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs *Mycopathologia*, **133**:1-7.
- Cabañes, F.J.; Abarca, M.L.; Bragulat, M.R. (1997). Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. *Mycopathologia*, **137**:107-113.

- Cabañes, F.J. (2000). Dermatofitosis animales: recientes avances. *Revista Iberoamericana de Micología*, **17**:8-12.
- Cafarchia, C.; Romito, D.; Capelli, G.; Guillot, J.; Otranto, D. (2006). Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *European Society of Veterinary Dermatology*, **17**(5):327-331.
- Camara-Lemarroy, C.R.; González-Moreno, E.I.; Rodríguez-Gutiérrez, R.; Rendón-Ramírez, E.J.; Ayala-Cortés, A.S.; Fraga-Hernández, M.L.; García-Labastida, L.; Galarza-Delgado, D.A. (2014). Clinical Features and Outcome of Mucormycosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, **2014**:1-5.
- Camatti-Sartori, V.; Magrini, F.E.; Crippa, L.B.; Marchetti, C.; Venturin, L.; Silva-Ribeiro, R.T. (2011). In vitro evaluation of plant extracts to control pathogenic fungi of flowers. *Revista Brasileira de Agroecologia*, **6**(2):117-122.
- Camili, E.C.; Benato, E.A.; Pascholati, S.F.; Cia, P. (2007). Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica*, **33**(3):215-221.
- Cao, C.; Liang, L.; Wang, W.; Luo, H.; Huang, S.; Liu, D.; Xu, J.; Henk, D.A.; Fisher, M.C. (2011). Common Reservoirs for *Penicillium marneffe* Infection in Humans and Rodents, China. *Emerging Infectious Diseases*, **17**(2):209–214.
- Cassone, A.; Casadevall, A. (2012). Recent progress in vaccines against fungal diseases. *Current Opinion in Microbiology*, **15**:427-433.
- Chaiwun, B.; Vanittanakom, N.; Jiviriyawat, Y.; Rojanasthien, S.; Thorner, P. (2011). Investigation of dogs as a reservoir of *Penicillium marneffe* in northern Thailand. *International Journal of Infectious Diseases*, **15**:236–239.
- Chan, J.F.W.; Lau, S.K.P.; Yuen, K.-Y.; Woo, P.C.Y. (2016). *Talaromyces (Penicillium) marneffe* infection in non-HIV-infected patients. *Emerging Microbes and Infections*, **5**:e19.
- Chermette, R.; Ferreiro, L.; Guillot, J. (2008). Dermatophytoses in Animals. *Mycopathologia*, **166**:385-405.
- Chong, Y.B.; Tan, L.P.; Robinson, S.; Lim, S.K.; Ng, K.P.; Keng, T.C.; Kamarulzaman, A. (2012). Penicilliosis in lupus patients presenting with unresolved fever: A report of 2 cases and literature review. *Tropical Biomedicine*, **29**(2):270–276.
- Cleaveland, S.; Laurenson, M.K.; Taylor, L.H. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emerge. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **356**:991-999.
- Coelho, A.C.; Alegria, N.; Rodrigues, J. (2008). Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **60**(4):1017-1020.

- Cramer, R.; Garbani, M.; Rhyner, C.; Huitema, C. (2014). Fungi: the neglected allergenic sources. *Allergy*, **69**:176–185.
- Dahiya, P.; Kamal, R.; Puri, A.; Saini, G.; Arora, A. (2012). Penicilliosis in a HIV-positive individual. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases*, **33**(1):38–40.
- Dankai, W.; Pongpom, M.; Vanittanakom, N. (2015). Validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR studies in *Talaromyces marneffei*. *Journal of Microbiological Methods*, **118**:42–50.
- Daszak, P.; Cunningham, A.A.; Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science*, **287**:443–449.
- de Ana, S.G., Torres-Rodriguez, J., Ramirez, E.A., Garcia, S.M.; Belmonte-Soler, J. (2005). Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, **16**(6):357-363.
- de Hoog, G.S.; Chaturvedi, V.; Denning, D.W.; Dyer, P.S.; Frisvad, J.C.; Geiser, D.; Gräser, Y.; Guarro, J.; Haase, G.; Kwon-Chung, K.-J.; Meis, J.F.; Meyer, W.; Pitt, J.I.; Samson, R.A.; Taylor, J.W.; Tintelnot, K.; Vitale, R.G.; Walsh, T.J.; Lackner, M.; ISHAM working group on Nomenclature of Medical Fungi (2015). Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. *Journal of Clinical Microbiology*, **53**(4):1056–1062.
- Deacon, J.W. (2006). *Fungal Biology*. 4<sup>th</sup> Edition. Blackwell Publishing Ltd., Malden, United States of America. ISBN: 978-1-4051-3066-0.
- Delost, M.D. (2015). *Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences*. Jones & Bartlett Learning, LLC, Massachusetts, United States of America. ISBN: 978-1-284-03231-4.
- Devi, S.B.; Devi, T.S.; Ningshen, R.; Devi, KhR.; Singh, T.B.; Singh, N.B. (2009). *Penicillium morneffei*, an emerging AIDS-related pathogen—a RIMS study. *Journal of the Indian Medical Association*, **107**:208–210.
- Duong, T.A. (1996). Infection Due to *Penicillium marneffei*, an Emerging Pathogen: Review of 155 Reported Cases. *Clinical Infectious Diseases*, **23**:125-130.
- Ellis, D. (2016). *Mycology Online*. The University of Adelaide, Australia. Retrieved from: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/welcome.html>. Consulted in July, 2016.
- Fang, Z.; Ouyang, Z.; Hu, L.; Wang, X.; Zheng, H.; Lin, X. (2005). Culturable airborne fungi in outdoor environments in Beijing, China. *Science of the Total Environment*, **350**(1-3):47-58.

- Gambale, W.; Correa, B.; Paula, C.R.; Purchio, A.; Larsson, C.E. (1987). Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, **24**(2):187-191.
- Gambale, W.; Larsson, C.E.; Moritami, M.M.; Corrêa, B.; Paula, C.R.; Framil, V.M.S. (1993). Dermatophytes and other fungi of the haircoat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. *Feline Practice*, **21**:29-33.
- Garrett, M.H.; Rayment, P.R.; Hooper, M.A.; Abramson, M.J.; Hooper, B.M. (1998). Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clinical & Experimental Allergy*, **28**:459–467.
- Ghosh, R.R.; Ray, R.; Ghosh, T.K.; Ghosh, A.P. (2014). Clinico-mycological profile of dermatophytosis in a Tertiary Care Hospital in West Bengal An Indian scenario. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **3**(9):655-666.
- Goering, R.V.; Dockrell, H.M.; Zuckerman, M.; Roitt, I.M.; Chiodini, P.L. (2013). *Mims' Medical Microbiology*. 5<sup>th</sup> Edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-0-7234-3601-0.
- Gortázar, C.; Ferroglio, E.; Höfle, U.; Frölich, K.; Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, **53**:241–256.
- Greene, C.E. (2012). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4<sup>th</sup> Edition. W.B. Saunders, Philadelphia, United States of America. ISBN: 978-1-4160-6130-4.
- Grillot, R. (1996). *Les mycoses humaines: Démarche diagnostique*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 2-906077-79-8.
- Havaux, X.; Zeine, A.; Dits, A.; Denis, O. (2005). A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. *Clinical & Experimental Immunology*, **139**:179–188.
- Holanda, A.A.R.; Fernandes, A.C.S.; Bezerra, C.M.; Ferreira, M.A.F.; Holanda, M.R.R.; Holanda, J.C.P.; Milan, E.P. (2007). Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, **29**(1):3-9.
- Hospenthal, D.R.; Rinaldi, M.G. (2015). *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections*. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer, Berlin, Germany. ISBN: 978-3-319-13089-7.
- Huang, S.N.; Harris, L.S. (1963). Acute disseminated penicilliosis: report of a case and review of pertinent literature. *American Journal of Clinical Pathology*, **39**:167-174.
- Igbinosa, O.; Dass, K.; Wortmann, G. (2015). Fever, Rash and Fungemia in a Traveler from South China. *Journal of Clinical Case Reports*, **5**(11):639-641.

- Ilhan, Z.; Karaca, M.; Ekin, I.H.; Solmaz, H.; Akkan, H.A.; Tutuncu, M. (2016). Detection of seasonal asymptomatic dermatophytes in Van cats. *Brazilian Journal of Microbiology*, **47**:225-230.
- Ilic, Z.; Crawford, D.; Egner, P.A.; Sell, S. (2010). Glutathione-S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **242**(3):241-246.
- Jacob, B.; Ritz, B.; Gehring, U.; Koch, A.; Bischof, W.; Wichmann, H.E.; Heinrich, J. (2002). Indoor Exposure to Molds and Allergic Sensitization. *Environmental Health Perspectives*, **110**:647–653.
- James, T.Y.; Litvintseva, A.P.; Vilgalys, R.; Morgan, J.A.; Taylor, J.W.; Fisher, M.C.; Berger, L.; Weldon, C.; du Preez, L.; Longcore, J.E. (2009). Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathogens*, **5**(5):e1000458.
- Jayanetra, P.; Nitiyanant, P.; Ajello, L.; Padhye, A.A.; Lolekha, S.; Atichartakarn, V.; Vathesatogit, P.; Sathaphatayavongs, B.; Prajaktam, R. (1984). Penicilliosis marneffeii in Thailand: report of five human cases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **33**(4):637-644.
- Kameswaran, M.; Raghunandhan, S. (2009). Saprophytic Mycotic Infections of the Nose and Paranasal Sinuses. *Otorhinolaryngology Clinics: An International Journal, September-December*, **1**(1):25-31.
- Kauffman, C.A.; Pappas, P.G.; Sobel, J.D.; Dismukes, W.E. (2011). *Essentials of Clinical Mycology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer, Berlin, Germany. ISBN: 978-1-4419-6639-1.
- Kavanagh, K. (2011). *Fungi – Biology and Applications*. 2<sup>nd</sup> Edition. Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom. ISBN: 978-0-470-97709-5.
- Kayser, F.H.; Bienz, K.A.; Eckert, J.; Zinkernagel, R.M. (2005). *Medical Microbiology*. Thieme, New York, United States of America. ISBN: 3-13-131991-7.
- Khan, A.A.H.; Karuppayil, S.M. (2012). Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**:405–426.
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J.A. (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10<sup>th</sup> Edition. CAB International, Oxon, United Kingdom. ISBN: 978-0-85199-826-8.
- Koch, R. (1882). The etiology of tuberculosis. *Berliner Klinischen Wochenschrift*, **15**:221-230.
- Kruse, H.; Kirkemo, A.M.; Handeland, K. (2004). Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, **10**:2067–2072.

- Kuiken, T.; Ryser-Degiorgis, M.-P.; Gavier-Widén, D.; Gortázar, C. (2011). Establishing a European network for wildlife health surveillance. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, **30**(3):755-761.
- Lam, K.Y.; Cheung, F.; Yam, L.Y.; Lee, C.H.; Fung, K.H. (1997). Atypical manifestations in a patient with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology*, **50**(2):174-176.
- Lemsaddek, A. (2008). Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. Universidade de Lisboa. Retrieved from: [http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1636/1/19513\\_ulsd\\_re479\\_Tese.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1636/1/19513_ulsd_re479_Tese.pdf). Consulted in June, 2016.
- Liofilchem (2008). Potato Dextrose Agar. Retrieved from: <http://www.liofilchem.net/>. Consulted in September, 2015.
- Liofilchem (2010). Dermatophyte Test Medium. Retrieved from: <http://www.liofilchem.net/>. Consulted in September, 2015.
- Liu, D. (2011). *Molecular Identification of Human Fungal Pathogens*. CRC Press, Florida, United States of America. ISBN: 978-1-4398-1241-9.
- Lo, C.Y.; Chan, D.T.; Yuen, K.Y.; Li, F.K.; Cheng, K.P. (1995). *Penicillium marneffe* infection in a patient with SLE. *Lupus*, **4**(3):229-231.
- Lunardi, L.W.; Aquino, V.R.; Zimmerman, R.A.; Goldani, L.Z. (2006). Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clinical Infectious Diseases*, **43**:60-63.
- Luo, D.Q.; Chen, M.C.; Liu, J.H.; Li, Z.; Li, H.T. (2010). Disseminated *Penicillium marneffe* infection in an SLE patient: A case report and literature review. *Mycopathologia*, **171**(3):191-196.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, D.H.; Stahl, D.A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. 14<sup>th</sup> Edition. Pearson, Illinois, United States of America. ISBN: 978-0-321-89739-8.
- Mahon, C.R.; Lehman, D.C.; Manuselis, G. (2011). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4<sup>th</sup> Edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-1-4160-6165-6.
- Mancianti, F.; Nardoni, S.; Cecchi, S.; Corazza, M.; Taccini, F. (2003). Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period. *Mycopathologia*, **156**(1):13-18.
- Mandell, G.L.; Diamond, R.D. (2000). *Atlas of Infectious Diseases: Fungal Infections*. Springer, Berlin, Germany. ISBN: 978-1-4757-9315-4.

- Maniar, J.K.; Chitale, A.R.; Miskeen, A.; Shah, K.; Maniar, A. (2005). *Penicillium marneffeii* infection: An AIDS defining illness. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, **71**:202–204.
- Mantovani, A.; Morganti, L.; Battelli G.; Mantovani, Al.; Poglayen, G.; Tampieri, M.P.; Vecchi, G. (1982). The role of wild animals in the ecology of dermatophytes and related fungi. *Folia Parasitologica*, **29**(3):279–284.
- Marchisio, V.F.; Gallo, M.G.; Tullio, V.; Nepote, S.; Piscozzi, A.; Cassinelli, C. (1995). Dermatophytes from cases of skin disease in cats and dogs in Turin, Italy. *Mycoses*, **38**:239–244.
- Markey, B.; Leonard, F.; Archambault, M.; Cullinane, A.; Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 9780723432371.
- Marques, S.A.; Camargo, R.M.P.; Abbade, L.P.F.; Marques, M.E.A. (2010). Mucormicose: infecção oportunística grave em paciente imunossuprimido: Relato de caso. *Diagnostico e Tratamento*, **15**(2):64-68.
- Mattei, A.S.; Beber, M.A.; Madrid, I.M. (2014). Dermatophytosis in Small Animals. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, **2**(3):1-6.
- McClatchey, K.D. (2002). *Clinical Laboratory Medicine*. 2<sup>nd</sup> Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, United States of America. ISBN: 0-683-30751-7.
- Meletiadis, J.; Meis, J.F.G.M.; Mouton, J.W.; Verweij, P.E. (2001). Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(2): 478–484.
- Mignogna, M.D.; Fortuna, G.; Leuci, S.; Adamo, D.; Ruoppo, E.; Siano, M.; Mariani, U. (2011). Mucormycosis in immunocompetent patients: a case-series of patients with maxillary sinus involvement and a critical review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, **15**(8):e533-e540.
- Misra, J.K.; Tewari, J.P.; Deshmukh, S.K.; Vágvölgyi, C. (2015). *Fungi From Different Substrates*. Apple Academic Press Inc., Canada, United States of America. ISBN: 978-1-4822-0960-0.
- Mohan, S.K. (2009). *Gram Stain: Looking Beyond Bacteria to Find Fungi in Gram Stained Smear – A laboratory guide for medical microbiology*. AuthorHouse, Indiana, United States of America. ISBN: 978-1-43896-028-9.
- Molina-López, R.A.; Adelantado, C.; Arosemena, E.L.; Obón, E.; Darwich, L.; Calvo, M.A. (2012). Integument Mycobiota of Wild European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) from Catalonia, Spain. *International Scholarly Research Network Microbiology*, **2012**:1-5.

- Moriello, K.A.; Deboer, D.J. (1991). Fungal flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **29**:285-292.
- Mueller, G.M.; Bills, G.F.; Foster, M.S. (2004). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 0-12-509551-1.
- Murray, P.; Rosenthal, K.S.; Pfaller, M.A. (2013). *Medical Microbiology*. 7<sup>th</sup> Edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-0-323-08692-9.
- Natale, A.; Regalbono, A.F.; Zanellato, G.; Cavalletto, M.; Danesi, P.; Capelli, G.; Pietrobelli, M. (2007). Parasitological Survey on Stray Cat Colonies from the Veneto Region. *Veterinary Research Communications*, **31**(1):241–244.
- Nichita, I.; Marcu, A. (2010). The Fungal Microbiota Isolated from Cats and Dogs. *Animal Science and Biotechnologies*, **43**(1):411-414.
- Nweze, E.I. (2011). Dermatophytoses in domesticated animals. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **53**(2):94-99.
- Nzytech (2016). GreenSafe Premium. Retrieved from: <https://www.nzytech.com/>. Consulted in August, 2016.
- Okten, S.; Asan, A. (2012). Airborne fungi and bacteria in indoor and outdoor environment of the Pediatric Unit of Edirne Government Hospital. *Environmental Monitoring and Assessment*, **184**(3):1739-1751.
- Oliveira, M.; Ribeiro, H.; Delgado, L.; Fonseca, J.; Castel-Branco, M.G.; Abreu, I. (2010). Outdoor allergenic fungal spores: comparison between an urban and a rural area in northern Portugal. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **20**(2):117-28.
- Paixão, G.C.; Sidrim, J.J.C.; Campos, G.M.M.; Brilhante, R.S.N.; Rocha, M.F.G. (2001). Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **53**(5):568-573.
- Pavan, R.; Manjunath, K. (2014). Qualitative Analysis of Indoor and Outdoor Airborne Fungi in Cowshed. *Journal of Mycology*, **2014**:1-8. ID: 985921.
- Pepper, I.L.; Gerba, C.P.; Gentry, T.G. (2015). *Environmental Microbiology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Elsevier Science & Technology Books, California, United States of America. ISBN: 978-0-12-394626-3.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer, Berlin, Germany. ISBN: 978-0-387-92206-5.
- Pommerville, J.C. (2014). *Fundamentals of Microbiology*. 10<sup>th</sup> Edition. Jones & Bartlett Learning, LLC, Massachusetts, United States of America. ISBN: 978-1-4496-4796-4.

- Ponce-Caballero, C.; Gamboa-Marrufo, M.; López-Pacheco, M.; Cerón-Palma, I.; Quintal-Franco, C.; Giacomán-Vallejos, G.; Loría-Arcila, J.H. (2013). Seasonal variation of airborne fungal propagules indoor and outdoor of domestic environments in Mérida, Mexico. *Atmosfera*, **26**(3):369-377.
- Pongsunk, S.; Andrianopoulos, A.; Chaiyaroj, S.C. (2005). Conditional lethal disruption of TATA-binding protein gene in *Penicillium marneffei*. *Fungal Genetics and Biology*, **42**(11):893–903.
- Ponikau, J.U.; Sherris, D.A.; Kern, E.B.; Homburger, H.A.; Frigas, E.; Gaffey, T.A.; Roberts, G.D. (1999). The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clinic Proceedings*, **74**:877–884.
- Prata, A.C.B. (2007). *Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas - Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares*, Aveiro, Universidade de Aveiro.
- Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (2002). *Microbiology*. 5<sup>th</sup> Edition. The McGraw–Hill Companies, New York, United States of America. ISBN: 0-07-282905-2.
- Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.; Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, Philadelphia, United States of America. ISBN: 0-7234-1711-3.
- Richardson, M.D., Warnock, D.W. (2012). *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. 4<sup>th</sup> Edition. Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom. ISBN: 978-1-4051-7056-7.
- Rimek, D.; Zimmermann, T.; Hartmann, M.; Prariyachatigul, C.; Kappe, R. (1999). Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in Germany. *Mycoses*, **42**(2):25-28.
- Roshanzamir, H.; Naserli, S.; Ziaie, B.; Fakour, M. (2016). Incidence of dermatophytes isolated from dogs and cats in the city of Baku, Azerbaijan. *Comparative Clinical Pathology*, **25**(2):327-329.
- Samonis, G.; Anatoliotaki, M.; Apostolakou, H.; Maraki, S.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V. (2001). Transient Fungemia Due to *Rhodotorula rubra* in a Cancer Patient: Case Report and Review of the Literature. *Infection*, **29**(3):173-176.
- Scott, D.W.; Miller, W.H.; Griffin, C.E. (2001). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 6<sup>th</sup> Edition. W. B. Saunders, Philadelphia, United States of America. ISBN: 978-0-7216-7618-0.
- Sellart-Altisent, M.; Torres-Rodríguez, J.M.; de Ana, S.G.; Alvarado-Ramírez, E. (2007). Microbiota fúngica nasal en sujetos alérgicos y sanos. *Revista Iberoamericana de Micología*, **24**:125-130.
- SENAI-SP (2015). *Microbiologia Aplicada A Processos Químicos Industriais*. SENAI-SP, São Paulo, Brazil. ISBN: 978-85-8393-200-0.

- Seok, H.; Ko, J.-H.; Shin, I.; Eun, Y.H.; Lee, S.-E.; Lee, Y.-B.; Peck, K.R. (2015). Disseminated *Talaromyces marneffei* and *Mycobacterium intracellulare* coinfection in an HIV-infected patient. *International Journal of Infectious Diseases*, **38**:86–88.
- Shams-Ghahfarokhi, M.; Aghaei-Gharehbolagh, S.; Aslani, N.; Razzaghi-Abyaneh, M. (2014). Investigation on distribution of airborne fungi in outdoor environment in Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, **12**:54-60.
- Sharma, R.; Deval, R.; Priyadarshi, V.; Gaur, S.N.; Singh, V.P.; Singh, A.B. (2011). Indoor fungal concentration in the homes of allergic/asthmatic children in Delhi, India. *Allergy & Rhinology*, **2**:21–32.
- Simon-Nobbe, B.; Denk, U.; Pöll, V.; Rid, R.; Breitenbach, M. (2008). The spectrum of fungal allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, **145**:58–86.
- Sinha, A.K.; Vashishta, B.R. (2014). *Botany for Degree Students: Fungi*. S. Chand & Company Ltd, New Delhi, India. ISBN: 81-219-2826-5.
- Sirisanthana, T. (2001). *Penicillium marneffei* infection in patients with AIDS. *Emerging Infectious Diseases*, **7**(3):561.
- Sparkes, A.H.; Gruffydd-Jones, T.J.; Shaw, S.E.; Wright, A.I.; Stokes, C.R. (1993). Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. *Veterinary Record*, **133**:57-61.
- Stojanov, I.M.; Jakšić, S.M.; Prodanov, J.Z. (2007). Presence and importance of saprophyte fungal organisms on dog skin. *Proceedings for Natural Sciences*, **113**:261-265.
- Sykes, J.E. (2014). *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-1-4377-0795-3.
- Talaro, K.P.; Chess, B. (2015). *Foundations in Microbiology*. 9<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill Education. New York, United States of America. ISBN: 978-0-07-352260-9.
- Tatem, A.J.; Rogers, D.J.; Hay, S.I. (2006). Global transport networks and infectious disease spread. *Advances in Parasitology*, **62**:293:343.
- Thakur, K.; Singh, G.; Agarwal, S.; Rani, L. (2007). Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an human immunodeficiency virus infected patient. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **25**(2): 166-168.
- Thermo Scientific (2012). 6X DNA Loading Dye. Retrieved from: <http://www.thermofisher.com/pt/en/home.html>. Consulted in August, 2016.
- Thermo Scientific (2012). GeneRuler DNA Ladder Mix. Retrieved from: <http://www.thermofisher.com/pt/en/home.html>. Consulted in August, 2016.
- Tibayrenc, M. (2011). *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-0-12-384890-1.

- Tlamçani, Z.; Er-rami, M. (2013). Fungal Opportunist Infection: Common and Emerging Fungi in Immunocompromised Patients. *Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases*, **2**(2):1-5.
- Tortora, G.R.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2010). *Microbiology - an Introduction*. 10<sup>th</sup> Edition. Benjamin Cummings, California, United States of America. ISBN: 978-0-321-55007-1.
- Valdigem, G.L.; Pereira, T.; Macedo, C.; Duarte, M.L.; Oliveira, P.; Ludovico, P.; Sousa-Basto, A.; Leão, C.; Rodrigues, F. (2006). A twenty-year survey of dermatophytoses in Braga, Portugal. *International Journal of Dermatology*, **45**:822–827.
- Vanittanakom, N.; Vanittanakom, P.; Hay, R.J. (2002). Rapid Identification of *Penicillium marneffe* by PCR-Based Detection of Specific Sequences on the rRNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(5):1739–1742.
- Vanittanakom, N.; Cooper Jr, C.R.; Fisher, M.C.; Sirisanthana, T. (2006). *Penicillium marneffe* Infection and Recent Advances in the Epidemiology and Molecular Biology Aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**(1):95-110.
- Varghese, G.M.; Pise, G.; Michael, S.; Jacob, M.; George, R. (2004). Disseminated *Penicillium marneffe* infection in human immunodeficiency virus infected individuals. *Journal of Postgraduate Medicine*, **50**:235–236.
- Volberding, P. (2008). *Global HIV/AIDS Medicine*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 978-1-4160-2882-6.
- Volberding, P.; Greene, W.C.; Lange, J.; Gallant, J.; Sewankambo, N. (2012). *Sande's HIV/AIDS Medicine: Medical Management of AIDS 2012*. 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. ISBN: 9781455706952.
- Warrell, D.A.; Cox, T.M.; Firth, J.D. (2005). *Oxford Textbook of Medicine*. 4<sup>th</sup> Edition. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. ISBN: 0-19-856978-5.
- WHO (2009). *Laboratory Manual for Diagnosis of Fungal Opportunistic Infections in HIV/AIDS Patients*. World Health Organization (South-East Asia), New Delhi, India.
- Wirth, F.; Goldani, L.Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, **2012**:1-7.
- Wong, S.Y.N.; Wong, K.F. (2011). *Penicillium marneffe* Infection in AIDS. *Pathology Research International*, **2011**:1-10. ID: 764293.
- Wu, T.C.; Chan, J.W.M.; Ng, C.K.; Tsang, D.N.C.; Lee, M.P.; Li, P.C.K. (2008). Clinical presentations and outcomes of *Penicillium marneffe* infections: a series from 1994 to 2004. *Hong Kong Medical Journal*, **14**:103–109.

- Xi, L.Y.; Lu, C.M.; Zhou, X.Y.; Wang, L.X.; Xie, S.S. (2004). Fifteen cases of penicilliosis in Guangdong, China. *Mycopathologia*, **158**(2):151-155.
- Xiang, Y.; Guo, W.; Liang, K. (2015). An Unusual Appearing Skin Lesion from *Penicillium marneffei* Infection in an AIDS Patient in Central China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **93**(1):3.
- Yang, E.; Wang, G.; Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Chow, W.-N.; Chong, K.T.K.; Tse, H.; Kao, R.Y.T.; Chan, C.-M.; Che, X.; Yuen, K.-Y.; Caia, J.J. (2013). Unraveling the Molecular Basis of Temperature-Dependent Genetic Regulation in *Penicillium marneffei*. *Eukaryotic Cell*, **12**(9):1214-1224.
- Yassin, M.F.; Almouqatea, S. (2010). Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **7**(3):535-544.

## Anexos

### Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO  
Comissão de Ética da UTAD



<b>Parecer da Comissão de Ética N:</b>	3/2016
<b>Data:</b>	22.01.2016
<b>Assunto:</b>	<b>Doc32/CE/2015</b> Projeto de investigação "Rastreamento de fungos patogénicos e oportunistas em animais domésticos, selvagens e em humanos: implicações na saúde pública"
<b>Requerente:</b>	Patricia Alves/Coord: Ana Cláudia Coelho

Considerando:

- as vantagens previstas para a saúde humana;
  - que estão asseguradas as condições de bem-estar humano e animal;
  - que estão cumpridas as condições de confidencialidade e consentimento informado dos participantes;
- a CE nada tem a opor ao desenvolvimento do projeto.

Pela Comissão de Ética  
A Presidente da Comissão

Maria da Conceição Azevedo

## Anexo 2 – Consentimento Informado

### Consentimento informado, livre e esclarecido para

Colheita de zangaratoas nasais para o estudo de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial - UTAD “Rastreio de fungos patogénicos e oportunistas em animais domésticos, selvagens e em humanos: implicações na saúde pública” por Patrícia Daniela Matos Alves.

Confirmando que expliquei ao indivíduo amostrado, de forma adequada e inteligível, os procedimentos necessários ao ACTO acima referido. As colheitas destinam-se exclusivamente a ser utilizadas para o Mestrado e publicações académicas associadas a este Mestrado, ficando à guarda e responsabilidade da docente Ana Cláudia Correia Coelho, Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

As amostras colhidas serão utilizadas para comparação de isolados fúngicos entre humanos e animais, estudo da prevalência de fungos e identificação dos principais fatores de risco associados ao isolamento dos fungos.

Em qualquer caso, é garantido que não serão apresentados quaisquer dados demográficos que identifiquem o indivíduo amostrado, confidencialidade das respostas. É igualmente garantido que a presente autorização pode ser retirada, em qualquer altura, sem que isso cause qualquer prejuízo para a pessoa amostrada, garantindo a participação voluntária.

Responsável pela proposta:

Nome:

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Por favor, leia com atenção todo o conteúdo deste documento. Não hesite em solicitar mais informações se não estiver completamente esclarecido/esclarecida. Verifique se todas as informações estão correctas. Se tudo estiver conforme, então assine este documento.

-----  
*“Declaro que concordo com o que foi proposto e explicado pela docente ou mestranda que assina este documento, tendo podido fazer todas as perguntas sobre o assunto. Autorizo a realização do acto indicado nas condições em que me foram explicadas.”*

\_\_\_\_\_ (Local), \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ (Data)

Assinatura: \_\_\_\_\_ Cód. Amostra: \_\_\_\_\_

Feito em duas vias: original para o processo clínico, duplicado para a pessoa que consente.

### Anexo 3 – Inquérito epidemiológico para amostras de humanos

#### Inquérito Epidemiológico - Rastreamento de fungos em humanos

Código Amostra: \_\_\_\_\_

Data da colheita: \_\_\_\_\_

Data de inoculação: \_\_\_\_\_

#### Identificação:

Sexo: M  F

Idade: ≤20  21-30  31-40  41-50  51-60  ≥61

Profissão: \_\_\_\_\_

#### Fatores de risco associados:

Convívio diário com animais? Sim  Não

Alergias? Sim  Não  Outras doenças respiratórias: \_\_\_\_\_

## Anexo 4 – Inquérito Epidemiológico para amostras de animais domésticos

### Inquérito Epidemiológico - Rastreio de fungos em animais

Código Amostra: \_\_\_\_\_

Data da colheita: \_\_\_\_\_ Data de inoculação: \_\_\_\_\_

#### Identificação do Animal

Espécie: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Cor: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M  F

1. Animal com lesões? Sim  Não

Se sim,

#### Localização das lesões:

Cabeça:  { Orelhas:   
Focinho:   
Nuca:

Dorso:   
Zona Pélvica:   
Abdómen:   
Cauda:

Membros:  { Anteriores:   
Posteriores:

#### Tipo:

Circular:  Alopecia:  Solitária:  Generalizada:  Eritema:  Descamação:

2. Algum proprietário apresenta lesões compatíveis com dermatofitose? Sim  Não

Se sim,

Atualmente:  > 2anos:  < 2anos:

#### Localização das lesões:

Virilhas:  Pescoço:  Mãos:  Unhas:  Pés:  Cabeça:   
Pernas:  Barriga:  Braços:

#### Tipo:

Circular:  Alopecia:  Solitária:  Generalizada:  Eritema:  Descamação:

**PRIMEIRO CASO DE DETEÇÃO DE *PENICILLIUM MARNEFFEI*, UM AGENTE PATOGÉNICO EMERGENTE, EM SACARRABOS (*HERPESTES ICHNEUMON*)**

Alves Daniela<sup>1,\*</sup>, Matos Ana Cristina<sup>2</sup>, Saraiva Sofia<sup>3</sup>, Soares Ana Sofia<sup>3</sup>, João Sérgio<sup>3</sup>, Figueira Luís<sup>2</sup>, Matos Manuela<sup>3,4</sup>, Coelho Ana Cláudia<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>2</sup>Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>4</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

\*([danielamalves3@gmail.com](mailto:danielamalves3@gmail.com))

**Palavras-chave:** *Penicillium marneffe*; Sacarrabos; Agente patogénico emergente

*Penicillium marneffe* é a única espécie do género *Penicillium* capaz de provocar doenças quer em seres humanos saudáveis quer em seres humanos imunodeprimidos (Anaissie *et al.*, 2009). É um fungo dimórfico intracelular facultativo que provoca infeções disseminadas e progressivas especialmente pacientes infetados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Chaiwun *et al.*, 2011; Seok *et al.*, 2015). Os casos reportados ocorreram exclusivamente na Ásia, nomeadamente na Tailândia, China, Vietnam, Taiwan, Singapura e Índia (Xiang *et al.*, 2015). No entanto, devido à migração intensa, casos de infeção devido a *P. marneffe* fora desta área geográfica têm sido identificados em pessoas que viajaram para essas regiões (Anaissie *et al.*, 2009). De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, nunca foi reportado nenhum caso de infeção por *P. marneffe* em humanos na Península Ibérica. O mesmo se verificou no que diz respeito aos animais.

O objetivo deste trabalho foi confirmar a presença de *P. marneffe* num sacarrabos encontrado morto no distrito de Castelo Branco. As amostras de pêlos foram analisadas recorrendo aos métodos micológicos de rotina e por técnicas de biologia molecular, isto é, inoculação em Potato Dextrose Agar, e posterior análise macroscópica e microscópica. Após o isolamento do fungo em pêlo que se suspeitava ser *P. marneffe*, foi feita a extração de DNA para se proceder à análise por Nested PCR. Este tipo de PCR baseia-se em duas reações com “primers” que amplificam sequências do gene 18S rRNA. A primeira amplificação é específica para fungos, resultando no aparecimento de uma banda de aproximadamente 600pb. Já na segunda reação, os “primers”, amplificam um fragmento de 400pb no caso de ser *P. marneffe*, o que não acontece caso se esteja na presença de outro fungo, sendo estes “primers” considerados específicos para *P. marneffe*.

De acordo com os resultados obtidos com a PCR, verificou-se a primeira deteção de *P. marneffe*, um importante agente patogénico emergente, em sacarrabos.

## Anexo 6 – Resumo de Comunicação em painel apresentado nas VIII Jornadas de Genética e Biotecnologia

### BIODIVERSIDADE FÚNGICA EM PÊLO DE RAPOSAS-VERMELHAS (*VULPES VULPES*)

Alves Daniela<sup>1,\*</sup>, Saraiva Sofia<sup>2</sup>, Soares Ana Sofia<sup>2</sup>, Alves Sandra<sup>1</sup>, Matos Manuela<sup>2,3</sup>, Matos Ana Cristina<sup>4</sup>, Coelho Ana Cláudia<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>2</sup>Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>3</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

\*([danielamalves3@gmail.com](mailto:danielamalves3@gmail.com))

**Palavras-chave:** Biodiversidade; Fungos; Raposas; Prevalência

O Reino Fungi está repleto de organismos de elevada variedade e complexidade que podem ser encontrados em qualquer local da natureza, nomeadamente no solo, água, plantas, animais e no Homem, desde que neles encontrem as condições necessárias ao seu desenvolvimento (Misra *et al.*, 2015). Atualmente, a prevalência de fungos em animais selvagens ainda não se encontra muito estudada. Sabendo que, em geral, os animais são considerados potenciais reservatórios fúngicos (Madigan *et al.*, 2014) é importante a realização deste tipo de rastreios.

O objetivo deste trabalho foi efetuar a identificação dos diferentes géneros fúngicos provenientes do pelo de raposas encontradas mortas no distrito de Castelo Branco. Para tal, colheram-se amostras de pêlo de 51 animais encontrados mortos durante a época venatória entre 2013 e 2015.

As amostras de pêlos foram analisadas recorrendo aos métodos micológicos de rotina, isto é, inoculação em Potato Dextrose Agar, e posterior análise macroscópica e microscópica. Foi calculada a prevalência e os respectivos intervalos de confiança (IC) 95%. A prevalência de fungos em raposas foi de 90,0% (IC 95%: 81,8%-98,2%). Foram identificados diferentes géneros e espécies de fungos filamentosos sobre o total de amostras estudadas. As prevalências foram: *Absidia* spp. (1,1%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Alternaria* spp. (3,3%; IC 95%: 0,0%-8,3%); *Aspergillus flavus* (1,1%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Aspergillus fumigatus* (1,1%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Aspergillus niger* (14,4%; IC 95%: 4,8%-24,1%); *Aureobasidium* spp. (3,3%; IC 95%: 0,0%-8,3%); *Cladophialophora* spp. (1,1%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Cladosporium* spp. (4,4%; IC 95%: 0,0%-10,1%); *Fusarium* spp. (2,2%; IC 95%: 0,0%-6,3%); *Geotrichum* spp. (5,5%; IC 95%: 0,0%-11,8%); *Mucor* spp. (34,4%; IC 95%: 21,4%-47,5%), *Onychocola* spp. (1,1%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Penicillium* spp. (5,5%; IC 95%: 0,0%-11,8%); *Rhizomucor* spp. (4,4%; IC 95%: 0,0%-10,1%); *Scedosporium* spp. (1,1%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Scopulariopsis* spp. (1,1%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Saksenea vasiformis* (4,4%; IC 95%: 0,0%-10,1%); *Trichothecium* spp. (2,2%; IC 95%: 0,0%-6,3%); *Ulocladium* spp. (1,11%; IC 95%: 0,0%-4,0%); *Verticillium* spp. (5,5%; IC 95%: 0,0%-11,8%).

Neste estudo o pêlo de raposas mostrou elevada biodiversidade fúngica, apresentando também prevalências dos géneros e espécies muito variáveis.

## ISOLAMENTO DE DERMATÓFITOS ZOOFÍLICOS EM RAPOSAS VERMELHAS (*VULPES VULPES*) E EM SACARRABOS (*HERPESTES ICHNEUMON*)

Saraiva Sofia<sup>1,\*</sup>; Alves Daniela<sup>2</sup>, Soares Ana Sofia<sup>1</sup>, Alves Sandra<sup>2</sup>, Matos Manuela<sup>2,3</sup>, Matos Ana Cristina<sup>4</sup>, Coelho Ana Cláudia<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>3</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

\*sofiateixeira19@gmail.com

**Keywords:** Dermatófitos zoofílicos; raposas; sacarrabos; prevalência.

Os dermatófitos são fungos que invadem a pele queratinizada dos mamíferos provocando dermatofitoses. As dermatofitoses são das doenças infecciosas mais comuns no mundo (Cafarchia *et al.*, 2013). Os dermatófitos ocupam 3 nichos ecológicos diferentes classificados como antropofílicos (relacionados com humanos), zoofílicos (associados com animais) e geofílicos (presentes no solo) e espécies dos três nichos estão relacionadas com doenças clínicas humanas (Achterman e White, 2012; Segal e Frenkel, 2014). A dermatofitose zoofílica é um grande problema público e de veterinária, visto que os animais são conhecidos por serem reservatórios de dermatófitos e podem, por isso, transmitir esse agente patogénico aos humanos (Aghamirian e Ghiasian, 2009).

O objetivo deste trabalho foi efetuar a identificação e estudar a prevalência de dermatófitos em pêlo de raposas e sacarrabos encontrados mortos no distrito de Castelo Branco. Para tal, colheram-se amostras de pêlo de 70 animais selvagens, 51 raposas e 19 sacarrabos encontrados mortos durante a época venatória entre 2013 e 2015.

As amostras de pêlos foram analisadas recorrendo aos métodos micológicos de rotina para identificação de dermatófitos, isto é, inoculação em Dermatophyte Test Medium® e posterior análise macroscópica e microscópica. Foi calculada a prevalência e os respectivos intervalos de confiança (IC) 95%. A prevalência de fungos em animais selvagens foi de 12,9% (IC 95%: 5,1%-20,8%). A prevalência em raposas foi de 7,8% (IC 95%: 0,4% to 15,2%) e em sacarrabos de 26,3% (14,2%-38,4%). Quer em raposas quer em sacarrabos foram isolados *Trichophyton* e *Microsporum canis*.

Neste estudo, o isolamento de dermatófitos zoofílicos em carnívoros selvagens foi elevado, pelo que o potencial zoonótico destes agentes não pode ser descurado.

**PRIMEIRO CASO DE DETEÇÃO DE *PENICILLIUM MARNEFFEI*,  
NUMA FUINHA (*MARTES FOINA*) INFETADA COM  
*MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS***

***D. Alves***<sup>1,\*</sup>, *A. C. Matos*<sup>2</sup>, *S. Saraiva*<sup>3</sup>, *M. Sousa*<sup>3</sup>, *S. Alves*<sup>1</sup>, *A. S. Soares*<sup>3</sup>, *S. João*<sup>3</sup>, *L. Figueira*<sup>2</sup>, *A. C. Coelho*<sup>4</sup>, *M. Matos*<sup>3,5</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>2</sup>Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>5</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal

\*([danielamalves3@gmail.com](mailto:danielamalves3@gmail.com))

**Palavras-chave:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; *Martes foina*; *Penicillium marneffe*

*Penicillium marneffe* é a única espécie do género *Penicillium* capaz de provocar doença, principalmente, em humanos imunodeprimidos. De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, nunca foram reportados casos de infeção por *P. marneffe* em humanos na Península Ibérica e, todos os casos europeus são de pessoas imunodeprimidas que viajaram até à Ásia.

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) pertence ao Complexo *Mycobacterium avium* e, é o agente etiológico de uma enterite granulomatosa de ruminantes. Os animais selvagens são considerados potenciais reservatórios contribuindo para a disseminação da infeção. Vários investigadores sugerem a existência de associação entre Map e a doença de Crohn.

O objetivo deste trabalho foi confirmar a presença de *P. marneffe* e Map numa fuinha encontrada morta no distrito de Castelo Branco. Após a colheita, a amostra de pêlo foi analisada recorrendo aos métodos micológicos de rotina, isto é, inoculação em Potato Dextrose Agar, e posterior análise macroscópica e microscópica. Foi ainda realizada colheita de tecidos para cultura microbiológica e PCR para rastreio de Map.

A análise de PCR revelou a presença de Map nos tecidos, tendo sido o animal considerado infetado. De acordo com os resultados obtidos em cultura micológica, verificou-se o primeiro isolamento de *P. marneffe* em fuinha. Em humanos está documentada a infeção por Complexo *Mycobacterium avium* e o isolamento simultâneo de *P. marneffe*. De acordo com a pesquisa efetuada este é o primeiro caso desta associação em animais e, o primeiro caso de *P. marneffe* em fuinhas.

## OCORRÊNCIA DE FALSOS POSITIVOS EM CULTURA DE DERMATÓFITOS – UM ERRO DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO EM MEDICINA VETERINÁRIA

S. Saraiva<sup>1,\*</sup>, A. C. Matos<sup>2</sup>, D. Alves<sup>3</sup>, L. Araújo<sup>3</sup>, S. Alves<sup>3</sup>, A. S. Soares<sup>3</sup>, S. João<sup>1</sup>, L. Figueira<sup>2</sup>, A. C. Coelho<sup>4</sup>, M. Matos<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>2</sup>Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>5</sup>Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal

\*sofiатеixeira19@gmail.com

**Palavras-chave:** Dermatofitos; DTM; Falsos positivos.

As dermatofitoses causadas por fungos dermatofitos são doenças infecciosas comuns apresentando-se como um problema económico e de saúde pública. Em clínica veterinária, o diagnóstico das dermatofitoses é efetuado, frequentemente através da observação macroscópica do meio Dermatophyte Test Medium® (DTM®), sem exames complementares microscópicos. Os produtos metabólicos dos dermatofitos provocam um aumento da alcalinidade do DTM®, ao contrário dos fungos saprófitas que tornam o meio ácido. Esta propriedade é a base do uso de indicadores de pH, como o vermelho de fenol, sendo que a mudança de cor de amarelo a vermelho num prazo de até 14 dias indica a presença de fungos dermatofitos.

Neste trabalho investigou-se a especificidade do meio DTM® para o isolamento de dermatofitos, nomeadamente, a ocorrência de falsos positivos. Para isso utilizou-se pêlo de 100 animais selvagens. As amostras de pêlos foram analisadas recorrendo então ao método referenciado e, foi efetuada uma posterior análise macroscópica e microscópica.

Das 200 amostras analisadas (100 em duplicado), 127 provocaram mudança de cor no meio DTM. Destas, 41 mudaram de cor entre os primeiros 7 a 14 dias mas apenas 3 foram confirmados como sendo dermatofitos. Após os 14 dias, 86 apresentaram mudanças no indicador de pH sendo que 5 foram confirmados como dermatofitos. Entre os fungos responsáveis por esta mudança os mais comuns foram identificados como *Geotrichum*, *Penicillium* e *Mucor*.

Estes resultados mostram a probabilidade de se efetuar um diagnóstico errado em clínica se não se recorrer ao exame microscópico complementar.

**Anexo 10 – Resumo submetido às X Jornadas de Biologia**

**Primeiro caso de deteção de *Talaromyces marneffe* em amostras nasais de humanos**

**D. Alves<sup>1\*</sup>, M. Matos<sup>2,3</sup>, S. Saraiva<sup>2</sup>, A. C. Matos<sup>4</sup>, S. Alves<sup>1</sup>, A. S. Soares<sup>2</sup>, S. João<sup>2</sup>, L. Figueira<sup>4</sup>, A. C. Coelho<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup>*Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal*

<sup>3</sup>*Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BiolSI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal*

<sup>4</sup>*Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal*

\*[danielamalves3@gmail.com](mailto:danielamalves3@gmail.com)

**Anexo 11 – Resumo submetido às X Jornadas de Biologia**

**Primeiro caso de deteção de *Talaromyces marneffe* num felino**

**D. Alves<sup>1,\*</sup>, S. Saraiva<sup>2</sup>, A. C. Matos<sup>3</sup>, S. Alves<sup>1</sup>, A. S. Soares<sup>2</sup>, S. João<sup>2</sup>, L. Figueira<sup>3</sup>, M. Matos<sup>2,4</sup>, A. C. Coelho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Ciências Veterinárias, CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal*

<sup>2</sup>*Departamento de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal*

<sup>3</sup>*Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal*

<sup>4</sup>*Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Lisboa, Portugal*

\*[danielamalves3@gmail.com](mailto:danielamalves3@gmail.com)